



Nouveaux rôles du complexe CCR4-NOT dans le contrôle de l'expression des gènes eucaryotes

Clément Chapat

► To cite this version:

Clément Chapat. Nouveaux rôles du complexe CCR4-NOT dans le contrôle de l'expression des gènes eucaryotes. Biologie cellulaire. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT : 2013LYO10139 . tel-01169332

HAL Id: tel-01169332

<https://theses.hal.science/tel-01169332>

Submitted on 29 Jun 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

L'ECOLE DOCTORALE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE, INTEGRATIVE ET
CELLULAIRE

pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 17 septembre 2013

par

Clément Chapat

**Nouveaux rôles du complexe CCR4-NOT dans le
contrôle de l'expression des gènes eucaryotes**

Directrice de thèse : Mme Laura Corbo

JURY :

Mme Martine Simonelig

Mme Dominique Weil

Mme Cécile Caron

M. Germain Gillet

Mme Laura Corbo

Président de l'Université**M. François-Noël GILLY**

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. PARROT

Département GEP

Directeur : M. N. SIAUVE

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : Mme S. FLECK

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. COLLIGNON

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. C. VITON

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Administrateur provisoire : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Parce que mes années de thèse furent une aventure riche en rencontres, je tiens à remercier les personnes qui m'ont entouré, encouragé et soutenu pendant ces années.

Pour cela je tiens à remercier le Professeur Alain Puisieux de m'avoir accueilli au sein du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, mais également pour le soutien qu'il m'a apporté lors de ma fin de thèse.

Je remercie chaleureusement ma directrice de thèse, Laura Corbo. Je lui suis tellement reconnaissant de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ma thèse au sein de son équipe. Je la remercie de sa confiance et de la liberté qu'elle m'a accordée pour avancer pas-à-pas pendant ces quatre années, pour les connaissances qu'elle m'a transmises lors de nos discussions toujours très enrichissantes. Merci d'avoir contribué à mon épanouissement tant sur le plan scientifique qu'humain.

Je tiens à remercier cordialement Madame Martine Simonelig et Madame Dominique Weil d'avoir accepté d'être mes rapporteurs de thèse. Je les remercie d'avoir pris le temps de lire et de juger mon travail. Je suis très honoré de vous compter parmi les membres de mon jury de thèse.

J'adresse mes remerciements à Monsieur le Professeur Germain Gillet, de m'avoir fait l'honneur d'être examinateur et Président de mon jury de thèse. Je le remercie également pour son soutien précieux lors de mes candidatures concernant mon avenir post-doctoral.

Je remercie sincèrement Madame Cécile Caron d'avoir accepté le rôle d'examinatrice dans mon jury de thèse. Je la remercie également d'avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse et d'avoir apporté d'excellents conseils et suggestions pour faire progresser mon travail.

Je tiens à remercier également Monsieur Martin Dutertre d'avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse et d'avoir pris le temps d'évaluer mon travail. Je le remercie pour ses conseils et son soutien, particulièrement lors de ma recherche de post-doc.

Au-delà de l'épanouissement scientifique, toutes ces années de thèse m'ont permis de m'enrichir humainement. Je tiens donc à remercier chaleureusement toutes les personnes avec qui j'ai eu l'occasion de travailler au centre Léon Bérard. Tout d'abord merci aux membres de l'équipe de Laura :

Kamel, mon tout premier superviseur dans l'équipe, je te remercie pour tes conseils et ta patience. Ce fût un plaisir de travailler à tes côtés sur notre légendaire « Caf-court »

Chloé K., merci pour les nombreuses discussions scientifiques de Cafistes, j'aurais fait de mon mieux pour faire aboutir le projet CAFI-IFN et que tes cellules C1/C4 passent enfin à la postérité.

Muriel, j'ai beaucoup apprécié ton enthousiasme et ton dynamisme au quotidien

Cécile, mon ACOO préférée, merci pour ton aide précieuse à la paillasse et ta bonne humeur permanente.

Coralie, avec qui j'ai partagé chaque jour l'aventure de la thèse avec ses hauts et ses bas. Eclate-toi bien à L.A.

Farida, un grand merci pour ton aide à la paillasse, pour ton soutien, ta gentillesse et ta bienveillance,

Et tous les collègues passés et présents : Marco en qui j'ai trouvé un ami sincère ; mon ex-voisine de paillasse Amandine P, merci pour ton incroyable bonne humeur qui a rythmé mes premières années de thèse, Loredana, Katia, Caterina, Stéphanie, Soleilman et Juliette, ainsi que Pascale Cohen et son groupe : Paul, Nhan, Julie et Evelyne. Je vous souhaite à tous bonne chance pour la suite, j'ai été ravi de travailler à vos côtés pendant toutes ces années.

Je remercie tout particulièrement les stagiaires et étudiants que j'ai eu la chance d'encadrer : Sarah Benoit, Florian Novat, Amandine Mosnier, Pierre Simonet et Trang Thi Luong : vous avez tous été géniaux, brillants et exceptionnels... et je suis fier d'avoir travaillé avec vous. En espérant vous avoir transmis ma passion pour la recherche fondamentale, je vous souhaite d'aller jusqu'au bout de vos rêves, et au-delà...

Merci à Ruth Rimokh pour nos échanges et son soutien depuis le début de ma thèse, un grand merci aux membres de son équipe : Daphné pour sa bonne humeur quotidienne, Thibault G pour les bons moments passés à taper dans un volant ou à organiser des Harlem Shakes secrets, la GG team : Julien P, Jonathan, Benjamin et Adrien, votre arrivée a bouleversé l'homéostasie du 4^{ème} étage. Un merci tout particulier pour Rudy, pour tes blagues, ta confiance, ton écoute et ta personnalité hors-norme. Je remercie également Laurent F pour toutes ces années, nos collaborations scientifiques, sportives et sanitaires ; grâce à toutes ces années passées à récurer la développeuse à tes côtés, à échanger nos billes d'agarose/protéine A/Salmon Sperm, à explorer la Sarra dans tous les sens, j'ai trouvé en toi un ami sincère, je te souhaite le meilleur à San Diego.

Je remercie chaleureusement les collègues du CRCL, et notamment Alexia (sans aucun doute mon italienne préférée après Laura), Thibault V. ; ma compatriote berjallienne Marion Chapi pour ta complicité et ta sympathie ; Sophie pour ton énergie et ton peps au quotidien. Un grand merci à Chloé T., j'ai apprécié nos discussions diverses et variées, ta personnalité hors-norme me manquera, ainsi qu'à Marion Cr. que j'aurais aimé connaître davantage, je te souhaite toute la réussite que tu mérites dans la team Mehlen et un brillant avenir.

Une mention spéciale à mes deux fidèles compères : Stéphane, cousin éloigné des Terres Froides, j'ai apprécié de t'avoir à mes côtés toutes ces années, merci pour tout ce que tu m'as fait découvrir, pour nos discussions et nos éclats de rire. Rémy, mon acolyte inséparable qui m'accompagne depuis l'ENS et sur qui j'ai toujours pu compter, un immense merci pour tout ce que tu m'as apporté, ta générosité, tes conseils, tes encouragements et tellement plus. Merci de m'avoir aidé à affronter tous les hauts et les bas de ma thèse.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont formé et encouragé tout au long de ces neuf années d'études, et notamment Christel Praillet qui a cru en moi dès le début, et mes mentors Philippe Durand et Marie-Hélène Perrard à qui je dois tellement, vous m'avez tout appris et transmis votre goût pour la recherche. Je remercie également mes anciens Chefs : Pierre Couble, Benjamin Loppin et Guillermo Orsi du CGMC, ainsi qu'Abdel Aouacheria et Yannis Guillemin de l'IBCP. A travers vos rencontres et grâce à votre soutien, j'ai su trouver la motivation pour aller jusqu'au bout de l'aventure.

Merci à l'ARC, à son comité scientifique et aux donateurs, qui m'ont soutenu financièrement et qui m'ont donné la chance de réaliser ma 4^{ème} année de thèse.

Bien sûr, je remercie ma famille : les femmes de ma vie : Sylvie, Elise et Camille. Merci d'avoir toujours été là pour moi, pour vos encouragements et votre soutien inconditionnel. Sans vous, rien de tout cela n'existerait. Maman, merci d'être là, pour ton courage et ta force de vivre, je serai toujours à tes côtés dans le bonheur comme dans les moments difficiles. Merci également à Eric, Claire et Jacques, pour votre soutien.

Enfin mes plus sincères remerciements vont à celle qui m'a tant soutenu ces dix dernières années ; qui a su par son amour et sa patience m'apporter force et sérénité. Merci Audrey d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir supporté dans les moments les plus difficiles de ma thèse. Sans toi, rien de tout cela n'aurait été possible.

Tables des matières

Avant propos	8
Chapitre 1 : Rappels bibliographiques	9
I. Aspects généraux de l'expression des gènes eucaryotes.....	10
A. Synthèse et maturation des ARNm	10
1) Structure de la chromatine et synthèse de l'ARNm	10
2) Initiation de la transcription	12
3) Elongation de la transcription	14
4) Maturation de l'ARNm	15
B. Export et traduction.....	21
1) Assemblage des mRNP et export.....	21
2) La traduction	22
C. Mécanismes de dégradation des ARNm	26
1) Dégradation dépendante de la déadénylation.....	27
2) Dégradation indépendante de la déadénylation.....	31
3) Surveillance nucléaire des ARNm aberrants.....	32
4) Surveillance cytoplasmique des ARNm aberrants.....	33
5) Régulation de la stabilité des ARNm	35
D. Régulation de l'expression par les ARN non codants.....	37
1) Les petits ARN non codants.....	38
2) Les longs ARN non codants.....	43
E. Régulations spatiales des ARNm	45
1) Compartiments nucléaires	45
2) Structures cytoplasmiques.....	46
II. Couplage entre la synthèse et la dégradation des ARNm.....	51
A. Couplage à l'échelle globale	51
B. Coordination liée au promoteur.....	52
C. Le concept d'empreinte transcriptionnelle.....	54
III. Le complexe CCR4-NOT	56
A. Le cœur du complexe	56
B. Structure du complexe.....	57
C. Fonctions du complexe.....	59

1) Modifications des histones	59
2) Initiation de la transcription	60
3) Elongation de la transcription	61
4) Contrôle qualité des ARN nucléaire et export	63
5) Contrôle qualité et dégradation des protéines	64
6) Dégradation des ARNm	65
7) Coordination de la synthèse et la dégradation des ARN	68
 . Chapitre 2 : Résultats	70
I. Article 1 hCAF1/CNOT7 régule la signalisation des Interférons en contrôlant le facteur STAT1	71
A. Introduction à l'article 1	72
B. La voie de signalisation des interférons	73
1) La voie canonique IFN/JAK/STAT1	73
2) Description de la protéine STAT1	74
3) Régulation de l'activité de STAT1	75
C. Résumé des résultats obtenus	78
1) Caractérisation des cellules invalidées pour hCAF1	78
2) Implication dans la dégradation des ARNm	78
3) Effet de l'inhibition de hCAF1 sur l'activité de STAT1	79
4) hCAF1, un nouveau partenaire de STAT1	79
5) Modèle proposé	80
II. Article 2 : Les isoformes hCAF1v1 et hCAFv2 utilisent des mécanismes distincts pour réguler l'expression des gènes	108
A. Introduction à l'article 2	109
B. Présentation de la protéine PRMT1	110
1) Description	110
2) Fonction cellulaire de PRMT1	113
C. Résumé de l'article 2	114
1) Caractérisation du variant hCAF1v2	114
2) Implication de hCAF1v2 dans la déadénylation	115
3) hCAF1v2 et la méthylation des arginines	115

. Chapitre 3 : Discussion des résultats et perspectives	137
I. CCR4-NOT, nouveau coordinateur de la voie IFN/JAK/STAT1	138
1) Une plateforme régulatrice de la voie JAK-STAT1.....	138
2) CCR4-NOT et les modifications de STAT1	139
3) CCR4-NOT et l'accessibilité de STAT1 à la chromatine	140
4) Régulation de l'immunité innée	141
5) Implication de hCAF1 dans la tumorigenèse	142
II. Régulation post-transcriptionnelle de la réponse IFN.....	143
1) CCR4-NOT et la stabilité des ARNm cibles de STAT1	143
2) Effet de STAT1 sur le destin de ces ARNm cibles	143
III. Multiplicité fonctionnelle de CCR4-NOT	145
1) hCAF1v2 et le complexe CCR4-NOT	145
2) Les isoformes hCAF1 et la famille BTG/TOB	146
3) Les isoformes hCAF1 et la méthylation des arginines.....	147
4) hCAF1 et le couplage synthèse/maturation des ARNm.....	149
 . Conclusion générale	 151
 . Bibliographie.....	 152

. Avant propos

La régulation de l'expression des gènes dans les cellules eucaryotes est le résultat d'une série de mécanismes complexes qui sont initiés par la transcription de l'ADN en ARN messagers (ARNm) dans le noyau et achevés par la traduction de l'ARNm en protéines dans le cytoplasme. Cette régulation est accompagnée par de nombreux points de contrôle tant au niveau de la synthèse, de la maturation, du transport nucléo-cytoplasmique des ARNm qu'au niveau de l'efficacité de la traduction et de la dégradation des ARNm. La bonne réalisation de toutes ces étapes est d'une grande importance puisqu'elles sont nécessaires à la production d'un ARNm mature capable d'être traduit dans le cytoplasme en une protéine fonctionnelle. Le complexe multiprotéique CCR4-NOT s'avère jouer un rôle « pivot » dans la régulation de l'expression des gènes *via* son intégration dans différentes voies allant de la synthèse des ARNm jusqu'à leur dégradation. Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'une de ses sous-unités catalytiques, la protéine hCAF1, et à son implication dans la régulation de l'expression des gènes en identifiant les cibles qu'elle était capable de réguler.

Pour une meilleure compréhension de ces travaux, nous avons réalisé dans un premier chapitre une synthèse bibliographique constituée de trois grandes parties. Tout d'abord, nous rappellerons brièvement les étapes conduisant à l'expression d'un gène eucaryote, de la synthèse et maturation des ARNm dans le noyau, jusqu'à leur traduction et dégradation dans le cytoplasme. Dans la seconde partie, nous exposerons les différentes données concernant l'existence d'un couplage entre les processus de transcription et de dégradation des ARNm. Dans une troisième partie, nous nous focaliserons sur le complexe CCR4-NOT en décrivant sa structure et ses fonctions, de la levure jusqu'aux métazoaires. Dans un deuxième chapitre, nous exposerons et discuterons des résultats que nous avons obtenus portant d'une part sur la fonction de hCAF1 et de CCR4-NOT dans le contrôle de la voie IFN/STAT1 et ayant aboutit à la publication d'un article dans *The EMBO Journal*. D'autre part, nous présenterons un second article, actuellement en cours de finalisation, et traitant de l'épissage alternatif du gène humain *hCaf1* qui génère deux isoformes présentant des divergences fonctionnelles. Enfin, après avoir énoncé les perspectives de ce travail, nous soulignerons en conclusion les éléments novateurs que nos recherches ont apportés concernant l'implication de CCR4-NOT dans le contrôle de l'expression des gènes eucaryotes.

. Chapitre 1 : Rappels bibliographiques

I. Aspects généraux de l'expression des gènes eucaryotes

A. Synthèse et maturation des ARNm

1) Structure de la chromatine et synthèse de l'ARNm

La synthèse d'un ARNm fait intervenir différentes régions d'ADN génomique modulant l'initiation de la transcription : les promoteurs (contenant notamment la boîte TATA), les séquences activatrices ou « *enhancers* » et les séquences inhibitrices ou « *silencers* ». Les « *enhancers* » et « *silencers* » sont localisées à des distances variables, en amont, en aval ou à l'intérieur du gène lui-même. Ces éléments cis-régulateurs permettent le contrôle de l'expression d'un gène *via* le recrutement de régulateurs transcriptionnels, des protéines qui vont interagir avec le promoteur et permettre ou non l'accessibilité de l'ADN à l'ARN polymérase II (ARN pol II) (Li et al., 1997).

Dans son état naturel, l'ADN est compacté autour d'une structure de base: le nucléosome. 146pb d'ADN sont enveloppées autour d'un octamère d'histones (H2B, H2A, H3, H4) et représente l'unité de base de la chromatine. L'état de condensation de cette structure chromatinienne au niveau des promoteurs des gènes conditionne leur état transcriptionnel (Kornberg, 2007, 1977). La régulation de l'expression des gènes fait généralement intervenir des activateurs et des répresseurs qui sont capables d'une part de recruter des complexes de remodelage de la chromatine tels que SWI/SNF et p300/CBP qui induisent des changements conformationnels au niveau du nucléosome (Bassett et al., 2009; Beato and Eisfeld, 1997; Ito et al., 1997; Varga-Weisz and Becker, 1995). Une étape importante dans la compréhension de l'influence de la chromatine sur la régulation génique a été la découverte de la méthylation de l'ADN et des modifications post-traductionnelles des histones. Ces modifications dites « épigénétiques » régulent l'ouverture et la fermeture de la double hélice d'ADN via des changements de charges électrostatiques au niveau du nucléosome, contrôlant l'accessibilité des séquences cis-régulatrices aux facteurs de transcription. Ces modifications chimiques altèrent la surface du nucléosome et agissent également en modulant le recrutement et la fixation de complexes régulateurs de la transcription (Bannister and Kouzarides, 2011; Berger, 2007).

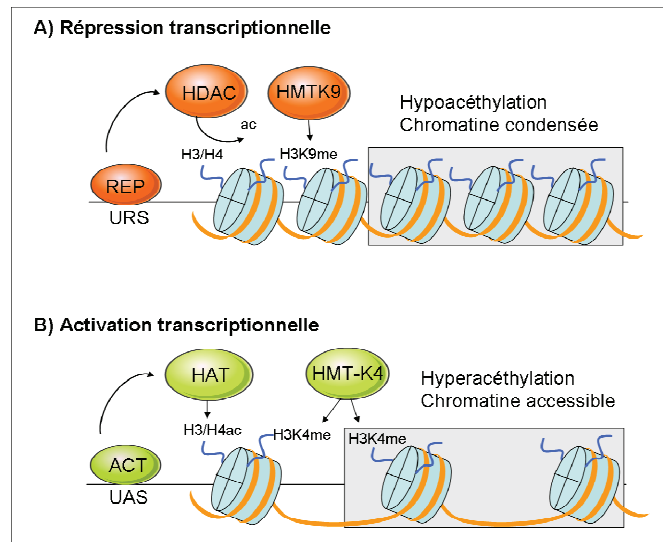


Figure 1: Modèle de régulation de la transcription par le remodelage de la chromatine. **A)** La transcription est réprimée par la fixation d'un répresseur (REP) sur une séquence répressive en amont du site de départ de la transcription (URS : Upstream Repressive Site). Le répresseur maintient la chromatine condensée via le recrutement des HDAC et HMT qui conduit à la déacétylation d'H3/H4 et la méthylation d'H3K9. **B)** L'activation transcriptionnelle repose sur la fixation d'un activateur (ACT) sur une séquence activatrice en amont (UAS), qui recrute des HAT et HMT conduisant à l'acétylation et à la méthylation des histones. HAT : Histones AcétylTransférases, HDAC : Histones DéAcétylases, HMT : Histones MéthylTransférases.

Les modifications d'histones ont lieu au niveau de leur extrémité N-terminale qui pointe à l'extérieur de la particule nucléosomale. Elles incluent l'acétylation, la phosphorylation, la méthylation, la sumoylation ou encore l'ubiquitination et ont des rôles différents selon le résidu et l'histone ciblée (Tableau 1). Les interprétations précoces de ce phénomène impliquaient l'existence de modifications activatrices et répressives vis-à-vis de la régulation génique. Ce modèle des modifications d'histones agissant comme un code (le « code histones ») a été proposé par Strahl et Allis en 2000 dans la revue *Nature*. (Jenuwein and Allis, 2001; Strahl and Allis, 2000). L'acétylation des histones est l'une des modifications les mieux connues. Elle favorise la transcription en diminuant les forces d'interaction entre l'ADN et les histones, et en créant des sites de fixation pour des complexes activateurs de la transcription possédant des bromodomains liant les lysines acétylées. L'état d'acétylation résulte d'un équilibre entre deux activités enzymatiques antagonistes : l'activité histone-acétyltransférase HAT et l'activité histone-désacétylase HDAC (Figure 1) (Kuo and Allis, 1998). La méthylation peut s'effectuer sur les résidus lysine ou arginine et selon les résidus méthylés ou le nombre de méthyl ajouté, elle est associée à une activation ou une répression de la transcription.

De nombreux travaux ont révélé par la suite que la régulation de la transcription implique des combinaisons complexes de modifications d'histones. Bien plus qu'un simple code, les modifications épigénétiques semblent davantage composer un langage chromatinien sophistiqué et nuancé dans lequel différentes combinaisons aboutissent à des effets transcriptionnels dynamiques (Berger, 2007).

Tableau 1 Les modifications de la chromatine		
Modification	Cible	Rôle transcriptionnel
Méthylation de l'ADN		
Cytosine méthylée	îlots CpG	Répression
Modifications post-traductionnelles des histones		
Lysine acétylée	H3 (9, 14, 18, 56), H4 (5, 8, 13, 16) H2A, H2B	Activation
Sérine/Thréonine phosphorylée	H3 (3, 10, 28), H2A, H2B	Activation
Arginine méthylée	H3 (17, 23), H4 (3)	Activation
Lysine méthylée	H3 (4, 36, 79) H3 (9, 27), H4 (20)	Activation Répression
Lysine ubiquitylée	H2B (123 ^{Levure} , 120 ^{Mammifères}) H2A (119 ^{Mammifères})	Activation Répression
Lysine sumoylée	H2B (6/7), H2A (126)	Répression
Proline isomérisée	H3 (30-38)	Activation/répression

2) Initiation de la transcription

Après ouverture de la chromatine, la synthèse des ARNm requiert l'assemblage de facteurs de transcription généraux (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF et TFIIH) en un complexe de pré-initiation (PIC) qui assure le chargement de l'ARN pol II au niveau du site de départ de la transcription. Cette machinerie transcriptionnelle de base s'assemble en un complexe d'environ deux megaDaltons sur le promoteur du gène cible. Ce complexe de pré-initiation est directement associé à la sélection du site de départ de la transcription, à l'ouverture de la

double hélice d'ADN, et à la dissociation de l'ARN pol II du promoteur (Grünberg et al., 2012; He et al., 2013; Kornberg, 2007; Matsui et al., 1980).

Plusieurs reconstitutions *in vitro* de cette étape ont permis de construire un modèle d'assemblage séquentiel du PIC (figure 2A). TFIID est le premier facteur spécifiquement recruté sur le promoteur. Il inclut la « TATA-binding protein » (TBP), une protéine nécessaire et suffisante pour la transcription basale des promoteurs contenant une boîte TATA. TFIIA et TFIIB sont ensuite recrutés pour stabiliser l'interaction entre TBP et le promoteur. La Pol II, probablement déjà associée à TFIIF, est ensuite ajoutée à ce complexe. Finalement, TFIIIE et TFIIH, requis pour l'ouverture de la double hélice, sont recrutés pour former un PIC transcriptionnellement compétent (He et al., 2013; Thomas and Chiang, 2006; Tyree et al., 1993). L'assemblage du PIC sur le promoteur est une étape suffisante pour l'activation basale de la transcription. Dans le cas d'une initiation de la transcription dépendante d'activateurs spécifiques, des co-facteurs généraux tels que les complexes SAGA et médiateur sont recrutés sur le promoteur pour augmenter l'efficacité d'assemblage du PIC (figure 2B) (Bhaumik, 2011; Chang and Jaehning, 1997).

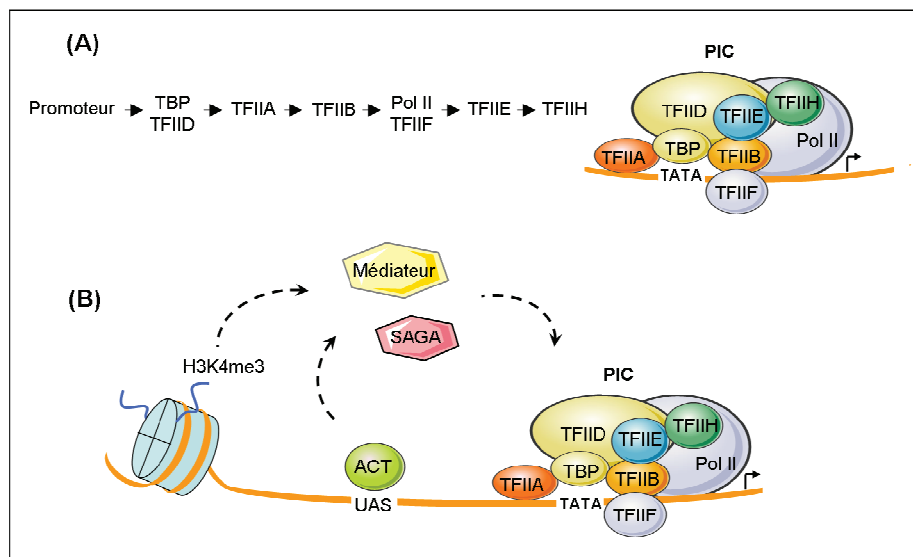


Figure 2 : Représentation schématique de l'assemblage séquentiel du complexe de pré-initiation (PIC) de la transcription chez les eucaryotes. A) Séquences de recrutement des facteurs de transcription généraux. B) Régulation de l'assemblage du complexe de pré-initiation. Des modifications épigénétiques, des séquences activatrices en amont (UAS) et des activateurs transcriptionnels (ACT) régulent l'assemblage du PIC en recrutant des complexes tels que SAGA et le médiateur, qui vont faciliter le recrutement de TBP sur le promoteur.

3) Elongation de la transcription

Une fois ce complexe établi, l'initiation de la transcription commence avec l'addition des nucléosides triphosphates (NTP) initiateurs dictés par la séquence d'ADN et la formation du premier pont phosphodiester. Le PIC est alors partiellement désassemblé et une partie des facteurs de transcription généraux reste sur le promoteur servant de support pour la formation d'un prochain PIC (Yudkovsky et al., 2000; Zawel et al., 1995). Le domaine C-terminal (CTD) de l'ARN pol II contient des répétitions multiples de l'heptapeptide YSPTSPS. Différentes formes de l'ARN Pol II sont décrites en fonction des degrés de phosphorylation du CTD : la forme IIA hypophosphorylée (Pol IIA) associée au complexe de préinitiation de la transcription et la forme IIO hyperphosphorylée (Pol IIO) impliquée dans l'élongation de la transcription. Les enzymes impliquées dans les processus de phosphorylation/déphosphorylation du CTD ont été décrites (Dahmus, 1996). La kinase CDK7 (sous unité de TFIIH) phosphoryle préférentiellement la sérine 5 pendant l'initiation de la transcription, et la kinase CDK9 (sous unité du facteur d'élongation P-TEFb) phosphoryle quant à elle la sérine 2 au cours de l'élongation (Figure 3). Chacune de ces phosphorylations peuvent être éliminées par des phosphatases, dont Fcp1 (F-cell production 1), indispensables pour le recyclage de la polymérase afin d'initier un nouveau cycle de transcription (Cho et al., 1999; Ghosh et al., 2008; Kamenski et al., 2004; Kobor and Greenblatt, 2002). Ces processus de phosphorylation réversibles et dynamiques régulent le cycle de transcription et coordonnent le recrutement de facteurs d'élongation *via* le domaine CTD. On distingue les facteurs d'élongation « classiques » qui régulent l'activité et la processivité de l'ARN Pol II, et les facteurs qui facilitent l'élongation du transcrit sur la matrice chromatinienne *via* le remodelage des nucléosomes et la modification des histones. La régulation de l'élongation présente un rôle central dans la coordination d'évènements qui vont résulter en la production efficace d'un ARNm et son export vers le cytoplasme (Hirose and Ohkuma, 2007a; Martinez-Rucobo and Cramer, 2013; Sims et al., 2004).

L'étape finale du cycle d'élongation est la terminaison. Elle intervient lorsque la polymérase franchit un site de polyadénylation. Deux complexes protéiques, CPSF (Cleavage and Polyadenylation Specificity factor) et CStF (Cleavage Stimulation Factor) reconnaissent les signaux de polyadénylation et de coupure de l'ARN. Ils clivent l'ARN, induisent le détachement de la polymérase de l'ADN et recrutent la poly-A polymérase qui va ajouter la queue poly-A.

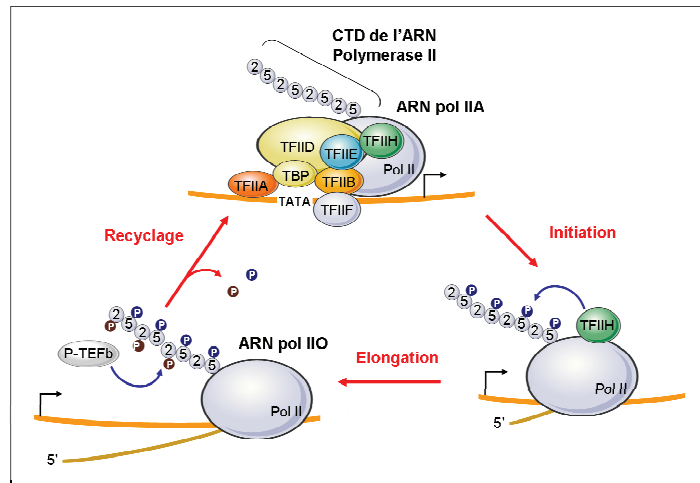


Figure 3: Phosphorylation cyclique et séquentielle du domaine CTD de la polymérase II au cours de la transcription. Deux formes d'ARN pol II sont décrites en fonction du degré de phosphorylation de son domaine C-terminal (CTD) sur les Ser5 et Ser2. Pol IIA correspond à la forme hypophosphorylée associée au complexe de pré-initiation, et Pol IIO est la forme hyperphosphorylée impliquée dans l'élongation. La kinase CDK7 (sous unité de TFIIF) phosphoryle préférentiellement la sérine 5 pendant l'initiation, et la kinase CDK9 (sous unité du facteur d'élongation P-TEFb) phosphoryle quant à elle la sérine 2 au cours de l'élongation. Chacune de ces phosphorylations peuvent être éliminées par des phosphatases

4) Maturation de l'ARNm

Au cours de sa synthèse, l'ARN est dit pré-messager, c'est-à-dire qu'il n'est pas encore mature pour la synthèse des protéines et va subir plusieurs modifications avant de sortir du noyau. L'étape de maturation se déroule de manière co-transcriptionnelle et implique l'addition de la coiffe à l'extrémité 5', l'excision des séquences introniques par les facteurs d'épissage et l'addition de la queue poly(A) en 3'. L'ARN pol II est un composant intégral de la coordination de ces processus, son CTD agissant comme une plateforme pour recruter les facteurs essentiels à la maturation (Hirose and Manley, 1998).

(a) Synthèse de la coiffe

La maturation débute par l'ajout de la coiffe, m^7GpppN -, à l'extrémité 5' de l'ARN néosynthétisé. La coiffe est constituée d'un résidu guanosine méthylé en position N7 relié au premier nucléotide de l'ARN par une liaison 5'-5' triphosphate (figure 4A). Il s'agit d'une structure fondamentale chez les eucaryotes qui protège l'ARN de la dégradation, favorise les étapes de maturation, d'export et de traduction (Furuichi and Shatkin, 1989; Shatkin, 1976). La mise en place de la coiffe (le « capping ») est réalisée par l'activité séquentielle d'une ARN 5'-triphosphatase (RTase), d'une guanylyltransferase (GTase), et d'une méthyltransferase (MTase) (Ghosh and Lima, 2010; Shuman, 2001). Le premier nucléotide de

l'ARN naissant est converti en un diphosphate par la 5'-triphosphatase, puis est modifié par la guanylyltransférase qui lui ajoute un groupement GMP. Enfin, la méthyltransférase finalise la structure de la coiffe en ajoutant un groupement méthyl en position N7 du GMP (figure 4B). La synthèse de la coiffe est un processus de maturation qui est directement couplé à la transcription (McCracken et al., 1997; Proudfoot et al., 2002). La GTase et la MTase sont en effet recrutées par l'ARN pol II en raison de leur capacité à interagir avec son CTD hyperphosphorylé. Leur recrutement sur l'ARN est une étape dépendante du complexe d'élongation et est spécifiquement stimulé par la phosphorylation de la sérine 5 du CTD (Cho et al., 1997; McCracken et al., 1997).

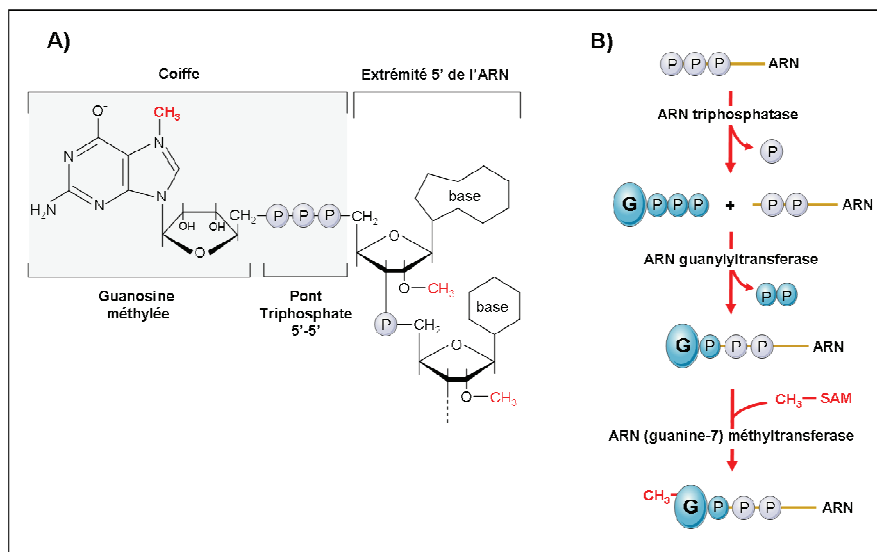


Figure 4 : Synthèse de la coiffe. A) Structure moléculaire de la coiffe. La coiffe est composée d'un résidu guanosine méthylé en position N7 et lié via un pont triphosphate au nucléotide situé à l'extrémité 5' de l'ARN. B) Synthèse nucléaire de la coiffe. Le phosphate à l'extrémité 5' de l'ARN pré-messenger est hydrolysé par l'ARN triphosphatase. Puis l'ARN guanylyltransférase transforme une molécule de GTP en GMP pour la transférer à l'extrémité diphosphorylée de l'ARN. Il y a formation d'un pont 5'-5' triphosphate. La synthèse de la coiffe se termine par la méthylation de résidu guanosine en position N7 par l'ARN (guanine-7) méthyltransférase via l'utilisation du composé S-adenosyl-L-méthionine (SAM) comme donneur de méthyl.

(b) Epissage de l'ARN

Les transcrits nouvellement synthétisés présentent des séquences codantes (exons) qui sont interrompues par des séquences non codantes (introns). L'épissage est un processus général qui permet l'élimination des introns *via* la réalisation de deux réactions de trans-estérification. Les exons d'une séquence codante sont ainsi reliés entre eux pour donner naissance à un ARN messager à maturité. Ce processus est rendu possible grâce à un complexe macromoléculaire nommé le spliceosome (Black, 2003; Maniatis and Reed, 1987). Son assemblage requiert les

petites particules ribonucléoprotéiques nucléaires (snRNP) U1, U2, U4, U5 et U6, ainsi que des protéines accessoires telles qu'U2AF, SF1 et les membres de la famille « Serine/arginine-Rich » (SR). Le spliceosome a deux fonctions : la reconnaissance des sites d'épissage et la catalyse des réactions permettant l'excision des introns et la ligation des exons (figure 5). Dans le cas de l'épissage alternatif, la sélection de différentes combinaisons d'exons à partir d'un même gène conduit à la formation de plusieurs profils d'ARNm spécifiques. Lors de la traduction, ces profils dicteront l'apparition de différents isoformes protéiques (Johnson and Vilardell, 2012).

Il est à noter que le processus d'épissage s'avère intimement couplé au cycle d'élongation de l'ARN pol II. Le CTD est un domaine crucial pour l'assemblage d'un spliceosome actif et le ciblage des facteurs d'épissage sur le site de transcription. Des expériences ont ainsi démontré

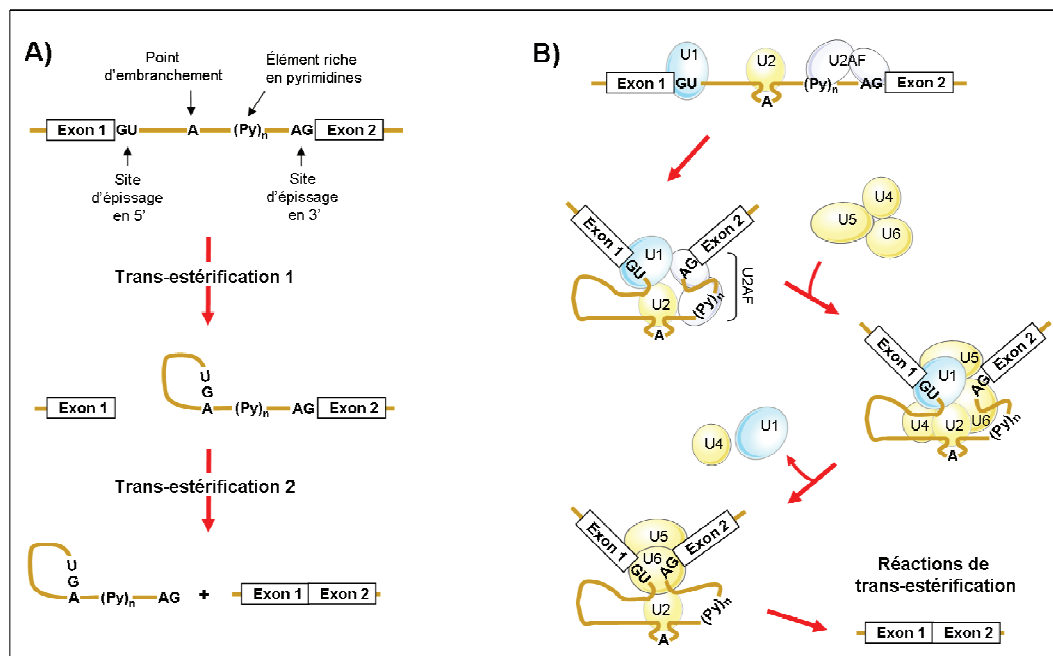


Figure 5 : L'épissage des ARN pré-messagers. A) Mécanisme général. L'épissage est régulé par des séquences consensus à la jonction exon/intron (site d'épissage en 5') et à la jonction intron/exon (site d'épissage en 3'). Au site d'épissage en 5', on retrouve la séquence AG|GURAGU (| : site d'épissage; R : purine; GU : nucléotides invariables), puis un site d'embranchement constitué d'une adénosine conservée : YNCUAY (Y : pyrimidine, N : aléatoire), suivi d'un élément riche en pyrimidines à une centaine de nucléotides en amont du site d'épissage en 3'. Le site d'épissage en 3' de l'intron est caractérisé par le motif YAG|RNNN. L'excision de l'intron est réalisée par deux réactions de trans-estérification. La liaison 3'-5' phosphodiester de la guanosine du site en 5' subit l'attaque nucléophile de l'adénosine du site d'embranchement, aboutissant à la formation d'un intron en lasso. L'extrémité 3' de l'exon en amont de l'intron réalise la 2^{ème} trans-estérification via l'attaque nucléophile de la liaison 3'-5' phosphodiester de la guanosine du site d'épissage en 3'. L'intron en lasso est détaché et il y a liaison des 2 exons adjacents. B) L'assemblage du spliceosome. La formation d'un pré-spliceosome débute par l'appariement d'U1 sur le site d'épissage en 5', par la fixation d'U2 sur le site de branchement et de l'hétérodimère U2AF sur le site d'épissage en 3'. Ce complexe est réorganisé via l'interaction entre U1, U2 et U2AF, favorisant le rapprochement des exons. L'arrivée du tri-snRNP U4/U5/U6 entraîne une modification du complexe permettant la libération d'U1 et U4 et la formation d'un spliceosome catalytiquement actif.

que l'utilisation d'une ARN pol II tronquée pour son CTD conduit à la synthèse d'ARN non épissés (Hirose and Manley, 1998; Hirose et al., 1999). Par ailleurs, d'autres travaux utilisant des constructions artificielles dans lesquelles différents promoteurs de l'ARN Pol II sont placés en amont d'un minigène contenant un exon alternatif encadré par des exons constitutifs de la β globine ont permis de mettre en évidence que l'identité du promoteur et son occupation par différents complexes transcriptionnels jouent un rôle fondamental dans la régulation de l'épissage (Cramer et al., 1997; Nogues et al., 2002). Il a également été montré que des régulateurs transcriptionnels ayant des effets opposés sur l'élongation de la polymérase influencent le choix du site d'épissage en modifiant la «processivité» de l'ARN Pol II (Kadener et al., 2001). Ceci suggère un modèle dans lequel les activateurs transcriptionnels qui réduisent la vitesse d'élongation de l'ARN Pol II augmentent l'inclusion des exons alternatifs, tandis que ceux qui la stimulent favorisent leur exclusion. Une étape importante dans la compréhension de l'épissage a été la découverte récente que la structure de la chromatine et les modifications épigénétiques des histones agissent comme des régulateurs centraux de l'épissage alternatif (Luco et al., 2011, 2010).

(c) Polyadénylation de l'ARN

La dernière étape de maturation des ARN pré-messagers suppose une maturation de leur extrémité 3' via l'étape de polyadénylation. Ce processus consiste à ajouter des résidus adénosines sur l'extrémité 3' de l'ARNm et se déroule en deux temps. L'ARN est tout d'abord clivé puis flanqué de 200 à 300 résidus adénosines par la PolyAdénylate Polymérase (PAP). Plusieurs rôles sont associés à la présence de ce segment d'adénosines. Comme la coiffe, la queue poly(A) participe à la stabilisation de l'ARN, à son transport vers le cytoplasme et à l'efficacité de la traduction (Colgan and Manley, 1997).

Le signal de clivage/polyadénylation, présent en 3' des messagers, est défini par plusieurs séquences consensus conservées chez tous les eucaryotes (Ozsolak et al., 2010). L'élément AAUAAA est essentiel à la polyadénylation de l'extrémité 3' de l'ARNm. D'autres séquences sont nécessaires pour reconstituer un signal de polyadénylation fonctionnel tels que les éléments riches en GU en aval de ce site (figure 6A). L'espacement entre ces deux séquences permet de définir le site de clivage qui est reconnu par deux complexes indispensables à la polyadénylation : CPSF (Cleavage and Polyadénylation Specificity Factor) et CstF (Cleavage Stimulatory Factor). Ces derniers s'associent également avec deux facteurs essentiels pour la réaction de clivage du pré-messager, CFI (Cleavage Factor I) et CFII

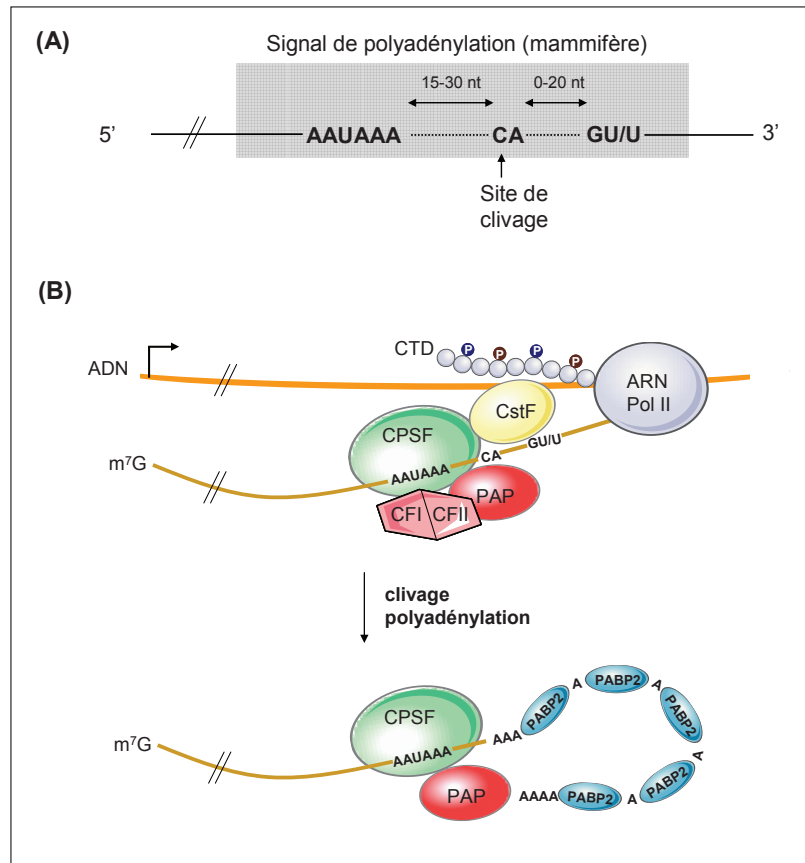


Figure 6 : La polyadénylation de l'ARN. A) Schéma général de la séquence consensus d'un site de polyadénylation de mammifère. B) Assemblage du complexe de clivage/polyadénylation sur l'extrémité 3' de l'ARNm. Les complexes protéiques CPSF et CstF reconnaissent les séquences consensus de polyadénylation. Le complexe CPSF va alors recruter la polymérase PAP et les complexes de clivage CF-I et CF-II. Suite au clivage de l'ARNm, l'enzyme de polyadénylation PAP ajoute des résidus adénosine. La protéine PABP2 se lie à la queue poly(A) et stimule l'extension de la queue poly(A).

(Cleavage Factor II), ainsi qu'avec l'enzyme de polyadénylation PAP (Proudfoot, 2011) (figure 5B). Comme pour le coiffage et l'épissage, l'ARN pol II est intimement couplée à la maturation de l'extrémité 3' du transcrit. En effet, trois des quatre sous-unités du complexe CPSF sont transférées sur le domaine CTD de l'ARN pol II après l'amorçage de la transcription et y demeurent associées tout au long de l'élongation. Ces facteurs se concentrent alors localement, rendant la polyadénylation plus efficace. De même, la présence du CTD au sein du complexe de clivage contribue à le rendre catalytiquement plus actif (Adamson et al., 2005; Hirose and Manley, 1998; Hirose and Ohkuma, 2007b).

Les ARNm peuvent être alternativement polyadénylés suite à la présence de plusieurs signaux de polyadénylation dans le pré-messager, influençant ainsi leur stabilité, leur localisation ou encore leur transport (Lutz, 2008). En effet, on estime que la moitié des messagers subissent une polyadénylation alternative générant à partir d'un seul gène la production de plusieurs

transcrits qui peuvent différer dans la longueur de leur 3'UTR ou qui conduisent à la production de protéines différentes, rajoutant un degré de complexité supplémentaire à la régulation de l'expression des gènes (Tian et al., 2005; Wilusz and Spector, 2010).

(d) *Edition de l'ARN*

L'édition ou « editing » est un processus qui conduit à l'altération post-transcriptionnelle de la séquence nucléotidique de l'ARN et qui se produit en parallèle des mécanismes de maturation cités précédemment. L'évènement le plus fréquemment observé chez les eucaryotes est la substitution d'un résidu Adénosine en Inosine (édition A vers I) (Farajollahi and Maas, 2010). L'inosine étant interprétée comme une guanosine par les machineries d'épissage et de traduction, ces changements peuvent influencer l'expression d'un gène *via* la modification de séquences régulatrices telles que les sites d'épissage alternatif, ou induire des substitutions d'acides aminés lors de la traduction (Rueter et al., 1999; Yang et al., 1995). L'édition A vers I est une réaction de déamination hydrolytique catalysée par la famille des protéines ADAR (Adénosine Deaminases Acting on RNA), contenant un domaine catalytique en C-terminal ainsi que de nombreux domaines de fixation à l'ARN (figure 7). L'édition de l'ARN s'avère le plus souvent restreint au noyau, en particulier lors d'évènements concernant des séquences introniques ou influencés par la présence de structures secondaires tridimensionnelles. Les protéines ADAR sont principalement retrouvées dans le noyau et s'avèrent être physiquement associées au CTD de l'ARN pol II et au spliceosome, suggérant l'existence d'un couplage entre les processus de transcription/maturation et d'édition (Laurencikienė et al., 2006; Raitskin et al., 2001).

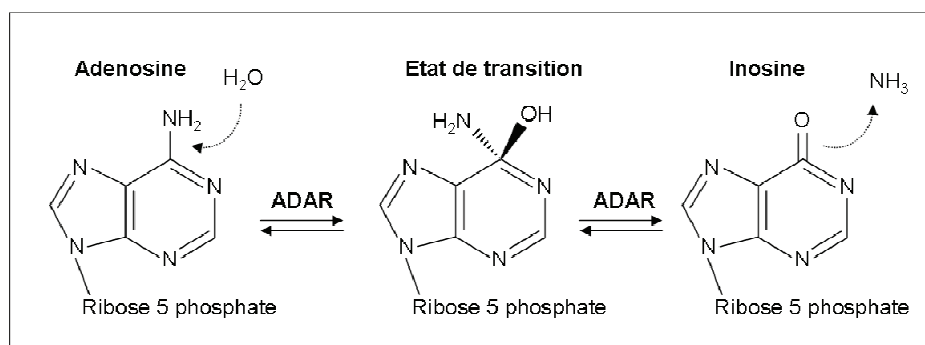


Figure 7 : Mécanisme d'édition de l'adénosine en inosine. Les enzymes ADAR catalysent la déamination hydrolytique de l'adénosine (A), formant une inosine (I) qui sera interprétée par la machinerie d'épissage et de traduction comme une guanosine (G).

B. Export et traduction

1) Assemblage des mRNP et export

Tout au long de sa maturation, l'ARN n'est jamais seul. Il est recouvert et compacté par des protéines se liant spécifiquement aux ARNm : les RBP (RNA-Binding Proteins). Cette association conduit à la formation d'une particule ribonucléoprotéique messagère (mRNP) et s'avère essentielle à l'export du transcrit vers le cytoplasme. Cet export s'effectue à travers une structure particulière de l'enveloppe nucléaire : le complexe du pore nucléaire (NPC), constitué de protéines nommées nucléoporines (Raices and D'Angelo, 2012). Ce mécanisme met en jeu de nombreux facteurs, conservés de la levure à l'homme, et s'associant à l'ARN de manière co-transcriptionnelle. L'un des premiers acteurs à se lier à l'ARN est le complexe de liaison à la coiffe CBC (Cap-Binding Complex) (Nojima et al., 2007). Puis des tétramères de hnRNPC s'associent avec les introns de l'ARN pré-messager naissant afin de le compacter à la manière d'un nucléosome et d'en mesurer la longueur pour réguler son futur export (McCloskey et al., 2012). Après épissage, une combinaison de facteurs définis comme le complexe de jonction d'exons (EJC : Exon Junction Complex) et les protéines SR (Serine-Arginine Rich) est déposée au niveau du site de jonction entre les exons afin de réguler la compaction de la particule mRNP immature (Le Hir et al., 2000; Singh et al., 2012). Le complexe EJC est déposé par le spliceosome 20-24 nucléotides en amont de chaque jonction exon-exon et demeure sur l'ARNm comme une marque résiduelle d'épissage. Il joue un rôle essentiel chez les mammifères dans le processus de surveillance des ARNm aberrants (voir section I. C. 4). La synthèse de la coiffe et l'épissage sont des événements essentiels au recrutement sur l'ARNm d'un complexe très conservé chez les eucaryotes : TREX (Transcription-Export). Ce complexe TREX va permettre le recrutement de facteurs d'export tels que l'hétérodimère Nxf1-Nxt1 (Mex67-Mtr2 chez la levure), le facteur CRM1 ou encore le récepteur karyophérine (Jani et al., 2012). La présence de l'un de ces facteurs est nécessaire à la liaison de la particule mRNP au pore nucléaire grâce à leur capacité à interagir avec les protéines FG-Nups, des sous-unités du NPC. Cette association initie le mouvement de la particule mRNP à travers le NPC *via* un mécanisme de diffusion facilitée (Müller-McNicoll and Neugebauer, 2013; Weis, 2007). Le transcrit est alors transloqué dans le cytoplasme où une partie des facteurs d'assemblage et d'export est retirée et réimportée dans le noyau (figure 8). De nouvelles RBP cytoplasmiques sont alors incorporées à la place. Un événement important est le remplacement du complexe de liaison à la coiffe CBC par le facteur eIF4E,

une sous-unité du complexe eIF4F indispensable à la prise en charge de l'ARNm par la machinerie de la traduction.

A noter que dans le cas où la maturation de l'ARNm et/ou le recrutement des facteurs d'export s'avère incomplète, le transcrit est reconnu par la machinerie de surveillance nucléaire, retenu dans le noyau et dégradé par l'exosome nucléaire (voir section I. C. 3).

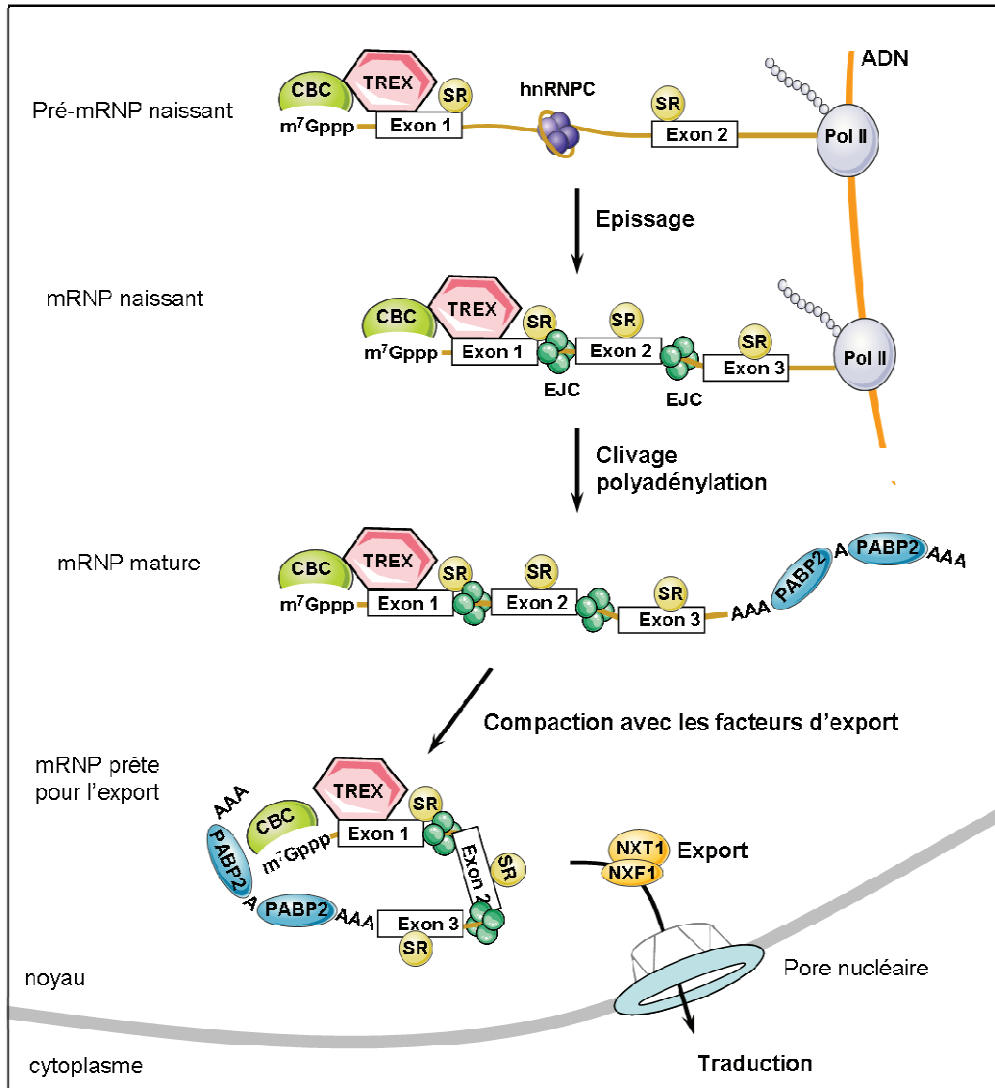


Figure 8 : Assemblage des mRNP et export. La figure illustre le modèle actuel de l'assemblage co-transcriptionnel des particules ribonucléoprotéiques (mRNP) mammifères à différents stades de la synthèse de l'ARN. Tout au long de l'élongation, des protéines de liaison aux ARN vont être recrutées afin de réguler la maturation et l'export du transcrit. (adapté de Müller-McNicol and Neugebauer, 2013)

2) La traduction

(a) Mécanismes d'initiation

Chez les eucaryotes, le cycle de traduction est régulé principalement au niveau de son initiation. Elle a pour but d'assembler un ribosome compétent contenant l'ARN de transfert

ARNt-Methionyl positionné sur le codon initiateur AUG de l'ARNm. Cette étape est régulée par un minimum de douze facteurs d'initiation eIF (eukaryotic Initiation Factor) composés de plus de 24 polypeptides distincts (figure 9).

L'initiation débute avec l'assemblage du complexe ternaire, formé de l'ARNt-Methionyl, eIF2 et d'un groupement GTP, qui va ensuite s'associer avec la petite sous-unité ribosomale 40S et les facteurs eIF1, 1A, 3 et 5 afin de former un complexe de pré-initiation (PIC). Ce dernier est alors recruté au niveau de l'extrémité 5' de l'ARNm pour balayer la région 5' non traduite (5'UTR), examinant chaque nucléotide jusqu'à la localisation du codon initiateur. Selon le modèle actuel du recrutement du PIC, l'ARNm doit être préalablement préparé par les facteurs eIF4 et la protéine liant la queue poly(A) : PABP. En effet, le complexe eIF4F, composé des protéines eIF4A, eIF4E et eIF4G, est recruté sur l'ARNm grâce à la capacité d'eIF4E à lier la coiffe (Sonnenberg et al., 1978). Ceci permet l'ancrage de l'ARN hélicase eIF4A au niveau de la région 5'UTR de l'ARNm afin de déplier les structures secondaires des messagers facilitant le recrutement du PIC sur les ARNm (Aitken and Lorsch, 2012; Grifo et

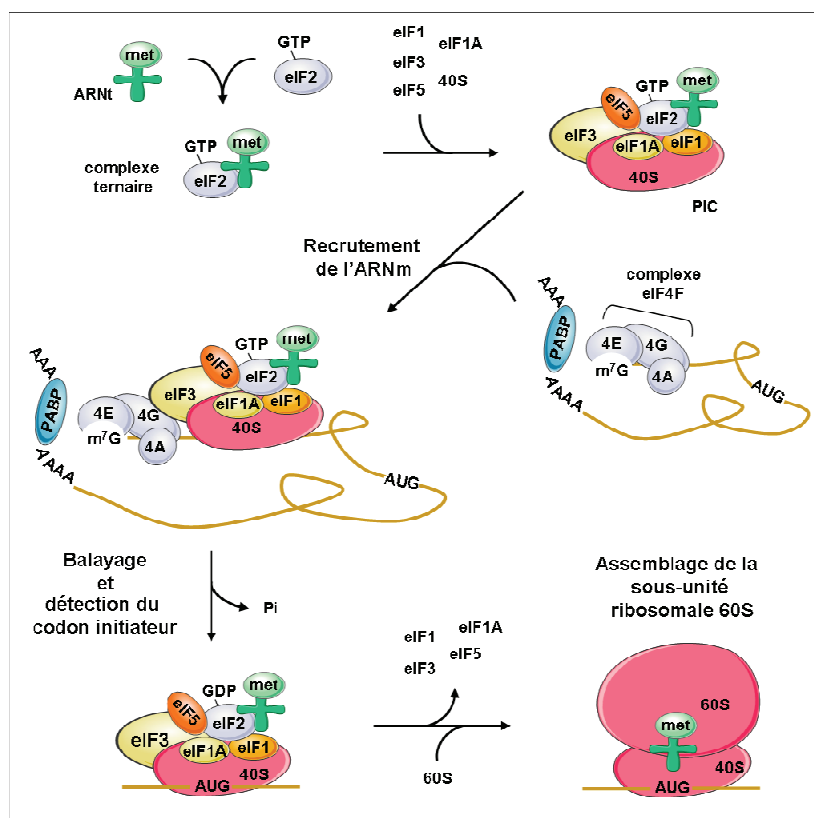


Figure 9 : Mécanisme général de l'initiation de la traduction. L'initiation commence avec la formation du complexe ternaire contenant eIF2-GTP et l'ARNt initiateur. Il est recruté sur la sous-unité ribosomale 40S avec l'aide d'eIF1, 1A, 3 et 5 pour former le complexe de pré-initiation (PIC). L'ARNm lié au complexe eIF4F et PABP s'associe au PIC qui balaye la région 5' jusqu'au codon AUG. Le complexe subit alors un remodelage qui permet le recrutement de la sous-unité 60S, formant ainsi un ribosome fonctionnel pour la synthèse protéique.

al., 1984; Lamphear et al., 1995; Linder and Slonimski, 1989; Rozen et al., 1990; Schütz et al., 2008). eIF4G fonctionne comme une plateforme capable de lier eIF4E, eIF4A, eIF3 mais également PABP. Ainsi, la liaison simultanée de la coiffe en 5' et de la queue en 3' par le complexe eIF4A-eIF4E-eIF4G-PABP imposerait une structure circulaire sur l'ARNm en « boucle fermée » qui faciliterait le recrutement initial de la sous-unité 40S (Wells et al., 1998).

Une fois le PIC positionné sur l'AUG, le facteur eIF1 est exclu induisant la conversion du GTP lié à eIF2 en GDP via le facteur eIF5 qui possède des propriétés activatrices des GTPases. Cet événement provoque un changement de conformation du complexe qui stabilise son interaction avec l'ARNm et l'ARNt-Met, et arrête le processus de balayage (Maag et al., 2005). A cette étape, eIF2-GDP et eIF5 se dissocient et la GTPase eIF5B s'associe à eIF1A pour activer le recrutement de la grande sous-unité ribosomale 60S et former le complexe d'initiation 80S. Ce rapprochement des sous-unités ribosomales induit le départ des facteurs eIF5B et eIF1A et permet au ribosome d'entrée dans la phase d'élongation de la synthèse protéique (Aitken and Lorsch, 2012).

En plus de cette machinerie de base, divers facteurs ont été identifiés comme régulateurs de l'initiation de la traduction. La protéine DHX29 est notamment capable de se fixer à la sous unité 40S du ribosome favorisant ainsi le balayage des ARNm long et ayant des 5' UTR très structurées (Parsyan et al., 2009; Pisareva et al., 2008). De plus, des données obtenues chez la levure et les mammifères suggèrent que l'initiation de la traduction implique d'autres membres de la famille des hélicases en plus de eIF4A tels que p97, apparenté à eIF4G, ou encore Ded1 (DDX3 chez les mammifères). En effet, p97 peut lier eIF4A et eIF3 mais est dépourvu de la région lui permettant d'interagir avec eIF4E, suggérant un rôle de cette protéine dans la traduction des ARNm dépourvus de coiffe (Hundsdoerfer et al., 2005; Imataka et al., 1997).

Bien que la plupart des ARNm utilise le processus de balayage, l'initiation de la traduction de certains ARNm est médiée par des IRES (Internal Ribosome Entry Sites). Les IRES permettent le recrutement direct du ribosome au niveau du codon de démarrage, indépendamment de la présence de la coiffe et du mécanisme de balayage. Ce sont des régions structurées de l'ARNm qui interagissent directement avec le ribosome ou avec les facteurs d'initiation de la traduction. Les IRES sont utilisées en particulier par les virus pour détourner à leur profit la machinerie cellulaire de traduction (Stoneley and Willis, 2004).

(b) Elongation et terminaison

L'élongation de la traduction se déroule en trois phases successives : la reconnaissance des codons par les ARNt (porteur d'un acide-aminé) au niveau du ribosome (décryptage), la synthèse de la liaison peptidique et le déplacement du ribosome sur le codon suivant (translocation). Ces étapes sont facilitées par les facteurs d'élongation eEF1 et eEF2 (Nygård and Nilsson, 1990). L'ensemble de ce processus est répété jusqu'à ce que le ribosome rencontre un codon stop (UAA, UGA, UAG) et initie le processus de terminaison. Une réaction d'hydrolyse libère alors le polypeptide formé et le ribosome se dissocie alors en sous-unités (Beaudet and Caskey, 1971). Les codons stops rencontrés au cours de l'élongation sont reconnus par un hétérodimère constitué des facteurs RF (release factor) eRF1 et eRF3 (Zhouravleva et al., 1995). La protéine eRF1 a été découverte en premier et sa fonction est de transmettre le signal de la présence d'un codon stop occupant le site A du ribosome au centre peptidyl-transferase. De façon surprenante, les caractéristiques structurales d'eRF1 sont proches de celles d'un ARNt. Le domaine N-terminal qui est impliqué dans la reconnaissance et la liaison au codon stop correspond ainsi au bras de l'anticodon, le domaine central à la tige liant l'acide aminé et le domaine C-terminal à la boucle variable de l'ARNt. Concernant eRF3, il possède une activité GTPase qui induit la conversion du GTP en GDP à l'intérieur du ribosome. Ce facteur nécessite la présence d'eRF1 pour son activité GTPase et les deux facteurs forment un complexe stable *in vivo* et *in vitro*. L'un des derniers modèles proposés concernant le rôle d'eRF3 au cours de la terminaison est que l'activité GTPase d'eRF3 assiste le facteur eRF1 dans la reconnaissance du codon stop. L'interaction stable entre eRF1 et le site A stimulerait l'hydrolyse du GTP par eRF3. Un changement de conformation pourrait alors s'opérer et permettrait l'induction de la libération de la chaîne peptidique (Frolova et al., 1994; Pisarev et al., 2007) (figure 10).

Le nombre de cycles de traduction étant le reflet de la quantité de protéine produite, il varie fortement en fonction du type d'ARNm et de la protéine pour laquelle il code. A noter qu'une molécule d'ARNm peut être traduite par plusieurs ribosomes en même temps, formant ainsi un polysome ou polyribosome. La formation du polysome est facilitée par la circularisation de l'ARNm et permet un meilleur recyclage des ribosomes (Moore, 2005). L'arrêt de la traduction des ARNm met en jeu de nombreux mécanismes qui conduisent généralement à la dégradation des transcrits.

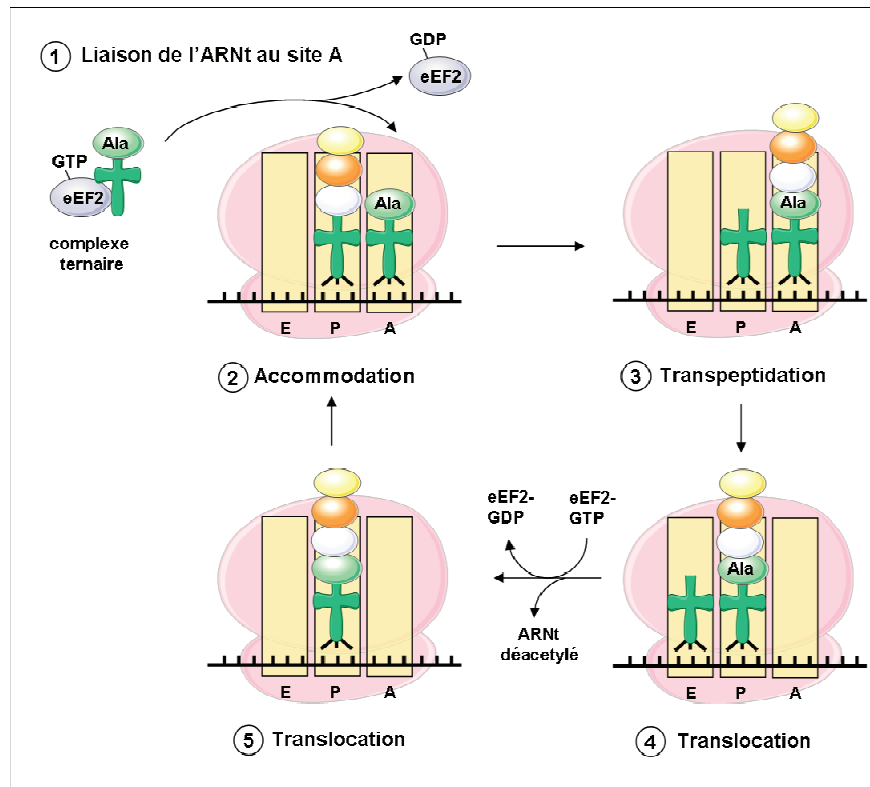


Figure 10 : Modèle général de l'élongation de la traduction. 1) Formation d'un complexe ternaire entre eEF1, un GTP et un ARNt-aminoacyl. 2) Ce complexe se lie au site A du ribosome. Après appariement codon/anticodon, eEF1 se dissocie lors d'une réaction hydrolysant le GTP. C'est l'étape d'accommodation. 3) La chaîne peptidique du site P se détache et se lie sur l'acide aminé du site A, c'est la transpeptidation. 4) L'ARNt déacétylé passe du site P à E pendant que l'ARNt lié au peptide naissant est déplacé de A à P. Cette étape appelée translocation implique le facteur eEF2. 5) Le résultat de cette réaction est le retour à l'étape initiale avec un ARNt-peptidyl sur le site P et le site A vide.

C. Mécanismes de dégradation des ARNm

Le contrôle de la dégradation des ARNm est important dans la régulation de l'expression des gènes sachant que dans la cellule, l'état d'équilibre de l'expression des transcrits est une combinaison entre le taux de synthèse et de dégradation des ARNm.

Comme décrit précédemment, l'ARNm mature dispose de deux déterminants le protégeant de la dégradation : la coiffe et la queue poly(A). Ainsi, l'initiation de sa dégradation doit impliquer soit la suppression de l'une de ces deux structures, soit un clivage interne par une attaque endonucléolytique. La plupart des ARNm normaux est dégradée *via* un mécanisme initié par la **déadénylation**, c'est-à-dire la suppression de la queue poly(A) par des enzymes nommées « déadénylases » (figure 11A). A l'issue de cette étape cruciale, l'ARNm pourra être :

- réadénylé pour rejoindre la machinerie traductionnelle

- décoiffé, c'est-à-dire subir une suppression de sa coiffe en 5' : c'est l'étape de « **decapping** ». L'ARNm décoiffé est alors dégradé dans le **sens 5'→3'** par l'exoribonucléase Xrn1
- attaqué par un complexe nommé exosome au niveau de son extrémité 3' déprotégée et dégradé dans le **sens 3'→5'**.

Il est à noter chez *Saccharomyces cerevisiae* que de rares ARNm peuvent subir une dégradation dépendante du decapping mais de manière indépendante de la déadénylation (figure 11B).

Chaque étape de la production d'un ARNm mature est susceptible de générer des erreurs. Afin de préserver la fidélité traductionnelle, l'évolution de la cellule eucaryote l'a conduite à développer des mécanismes de détection et de dégradation des transcrits aberrants. Les transcrits présentant une maturation inappropriée sont retenus et dégradés directement dans le noyau. En parallèle dans le cytoplasme, plusieurs voies dépendantes de la traduction ont été décrites :

- la voie NMD (Non-Sens Mediated Decay)
- la voie NSD (Non-Stop Decay)
- la voie NGD (No-Go Decay).

Ces mécanismes de surveillance cytoplasmique se produisent lors du tout premier cycle de traduction : le cycle pionnier. Il est initié par le complexe de liaison à la coiffe CBC et permet la détection et la dégradation des ARN présentant un codon-stop prématuré ou des structures secondaires susceptibles de bloquer le ribosome. C'est à l'issue du cycle pionnier qu'est remodelé le contenu de la particule mRNP et que se produit notamment le remplacement du complexe CBC par eIF4F (Gao et al., 2005; Ishigaki et al., 2001).

1) Dégradation dépendante de la déadénylation

(a) La déadénylation

La déadénylation s'avère être une étape limitante de l'expression d'un gène puisque la stabilité de l'ARNm dépend du niveau de digestion de la queue poly(A) et ce chez plusieurs espèces (Decker and Parker, 1993; Grosset et al., 2000; Wreden et al., 1997). Trois complexes enzymatiques responsables de la déadénylation ont été identifiés chez les eucaryotes : les enzymes PAN2 et PAN3 (Poly(A) Nucléase), PARN (Poly(A) RiboNucléase) et les

déadénylases CCR4 et CAF1 appartenant au complexe CCR4-NOT. Bien que présentant des caractéristiques fonctionnelles spécifiques, ces complexes enzymatiques font partie de la famille des RNase D appartenant à la superfamille des DEDD (D-Aspartate, E-Glutamate) (Ren et al., 2002; Zuo and Deutscher, 2001). Leur activité déadénylase nécessite du Mg^{2+} et entraîne la libération de 5'-AMP comme produit de réaction (Körner and Wahle, 1997; Lowell et al., 1992; Ren et al., 2004; Sachs and Deardorff, 1992; Uchida et al., 2004).

- PAN2-PAN3

Le complexe PAN, premier complexe de déadénylation identifié chez les eucaryotes, possède 2 sous-unités: PAN2 qui possède l'activité catalytique et PAN3 requise pour réguler l'activité enzymatique de PAN2 (Boeck et al., 1996). Son activité poly(A) nucléase est dépendante des protéines PABP associées à la queue poly(A) (Uchida et al., 2004). Chez la levure, PAN2-PAN3 est impliqué dans le raccourcissement de la queue poly(A) jusqu'à atteindre une taille

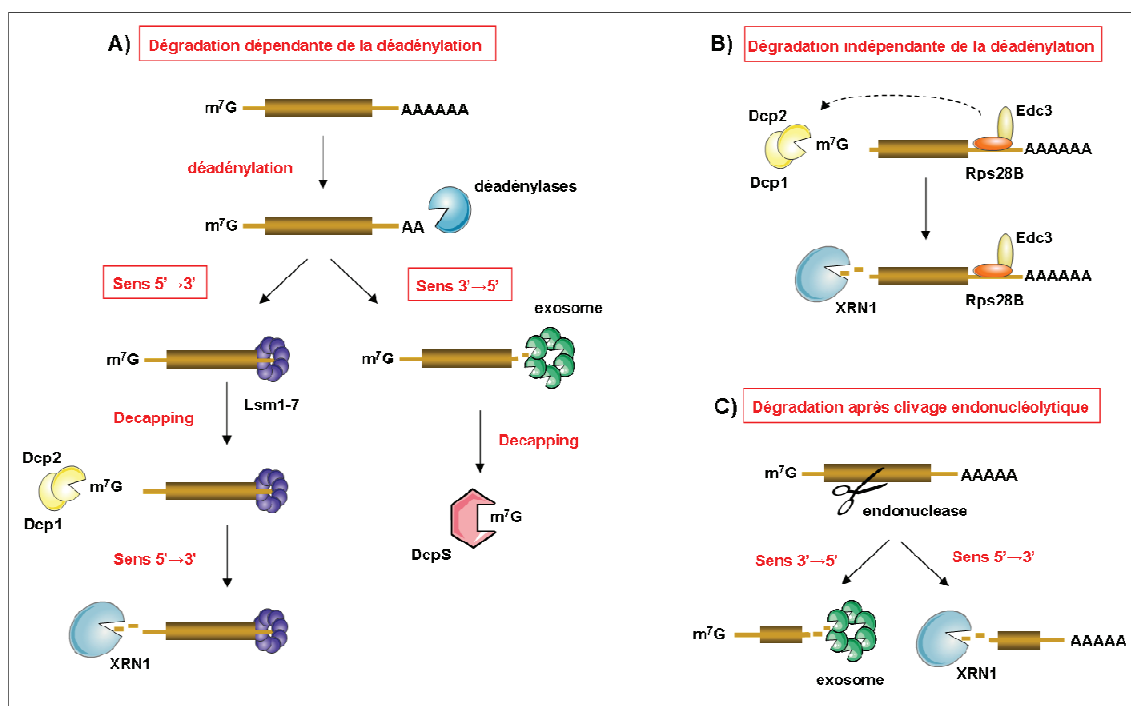


Figure 11 : Mécanismes généraux de dégradation des ARNm normaux. A) Dégradation dépendante de la déadénylation. La queue poly(A) est supprimée par l'activité des déadénylases cytoplasmiques. Après déadénylation, l'ARNm peut être dégradé par deux mécanismes. Dans la voie du decapping, le complexe LSM1-7 s'associe avec la région non traduite en 3' de l'ARNm et induit le decapping par le complexe DCP1-DCP2. L'ARNm décoiffé est dégradé par l'exonuclease XRN1. De manière alternative, l'ARN déadénylé peut être dégradé dans le sens 3'→5' par l'exosome et la coiffe est hydrolysée par l'enzyme de decapping Scavenger (DcpS). B) Dégradation indépendante de la déadénylation. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la machinerie de decapping peut être recrutée par des facteurs tels qu'Edc3 et Rps28B. L'ARN décoiffé est ensuite dégradé par XRN1. C) Dégradation après clivage endonucléolytique. L'initiation se fait via un clivage interne de l'ARNm, libérant deux fragments déprotégés qui seront dégradés par XRN1 et l'exosome.

standard de 60-80 nt (Brown et al., 1996). De même, chez les mammifères, l'étude de la dégradation de l'ARNm rapporteur de la β -globine a montré le rôle de PAN2-PAN3 dans la réduction d'une queue poly(A) initiale de 200 nt à environ 80 nt. La suite du processus de déadénylation est réalisée par le complexe CCR4-NOT (Yamashita et al., 2005).

- PARN

PARN, initialement connue sous le nom de DAN (DeAdenylating Nuclease) est retrouvée chez de nombreuses espèces eucaryotes comme *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana*, (Chiba et al., 2004; Reverdatto et al., 2004), *Xenopus laevis* et chez les mammifères (Körner and Wahle, 1997; Körner et al., 1998) mais est toutefois absente du génome de *Saccharomyces cerevisiae* et de *Drosophila melanogaster*. PARN agit sous la forme d'un homodimère et son activité est dépendante de la coiffe (Wu et al., 2009; Yamashita et al., 2005) mais inhibée par les PABP et les protéines qui se fixent sur la coiffe (Dehlin et al., 2000; Gao et al., 2000). PARN a été particulièrement décrite dans le processus de déadénylation des ARNm maternels lors de la maturation des ovocytes de *Xenopus laevis*, et s'avère essentielle lors de l'embryogenèse chez la plante (Chiba et al., 2004; Reverdatto et al., 2004).

- Le complexe CCR4-NOT

Le complexe CCR4-NOT est un large complexe de 9 sous-unités minimum, possédant 2 déadénylases : CCR4 et CAF1 (ou POP2) (J. Chen et al., 2002a; Tucker et al., 2002a, 2001). Le complexe CCR4-NOT est conservé au cours de l'évolution tant au niveau de sa composition protéique qu'au niveau de son activité déadénylase (Bianchin et al., 2005; Liang et al., 2009a; Temme et al., 2004; Viswanathan et al., 2004). Chez la levure, la protéine CCR4 semble être la principale déadénylase, alors que chez les mammifères c'est la protéine CAF1 qui contribue majoritairement à la déadénylation globale. Chez l'homme, il existe deux protéines homologues de la protéine CAF1 de levure : hCAF1 (CNOT7) et hPOP2 (CNOT8) et deux homologues de la protéine CCR4 de levure, hCCR4a (CNOT6) et hCCR4b (CNOT6L) qui possèdent toutes une activité déadénylase intrinsèque. Cependant, les protéines hCAF1 et hPOP2 appartiennent à la famille des déadénylases à domaine DEDD tandis que les protéines hCCR4a et hCCR4b appartiennent par homologie de séquence à la famille des Endonucléase-Exonucléase-Phosphatase (EEP) (Aslam et al., 2009; Mittal et al.,

2011a). Ce complexe étant au centre de mon travail de doctorat, la section III se focalisera entièrement sur son implication dans le contrôle de l'expression des gènes.

De manière générale, la déadénylation s'avère être un processus biphasique qui fait intervenir dans un premier temps le complexe PAN2-PAN3 qui va raccourcir la queue polyA d'environ 100 nucléotides, puis dans un second temps le complexe CCR4-NOT qui va induire une dégradation rapide (Yamashita et al., 2005). Cependant, les mécanismes de transition entre les deux phases restent encore méconnus.

(b) Decapping et dégradation dans le sens 5'-3'

Le raccourcissement en 3' par la déadénylation entraîne alors l'activation du clivage de la coiffe en 5' par le complexe enzymatique Dcp1/Dcp2 (Muhlrad et al., 1994). Deux produits sont ainsi générés : un ARNm doté d'une extrémité 5' monophosphate, substrat de l'exonucléase 5'-3' Xrn1, et une structure de coiffe libre constituée de 7mGDP, qui sera digérée par une autre enzyme de clivage de la coiffe, Dcp Scavenger (DcpS). Chez *S. cerevisiae*, la machinerie de decapping est composée d'un dimère de Dcp1 et Dcp2. Dcp2 est la sous-unité catalytique grâce à son domaine Nudix/MutT, caractéristique des protéines de la famille des pyrophosphatases impliquées dans le clivage des nucléotides diphosphates (Bessman et al., 1996; Lykke-Andersen, 2002; Wang et al., 2002). Dcp1 serait requis pour stimuler l'activité de Dcp2. Il a en effet été démontré chez la levure que Dcp1 est nécessaire au decapping *in vivo* et *in vitro* (Beelman et al., 1996; Hatfield et al., 1996; Steiger et al., 2003). Un decapping efficace requiert également de nombreux facteurs accessoires tels que le complexe heptamérique Lsm1-7 qui se lie à l'extrémité 3' de l'ARNm déadénylé pour activer le decapping (Tharun and Parker, 2001; Tharun et al., 2000). C'est aussi le cas de Hedls/Ge-1/Edc qui semble agir comme une molécule adaptatrice entre Dcp2 et Dcp1 et qui est indispensable à l'activité catalytique de Dcp2. Les facteurs Ge-1, Dcp1, et Dcp2 font parties d'un complexe protéique multimérique qui inclue également EDC3 (une protéine Lsm) et l'ARN hélicase RCK/p54 (Fenger-Grøn et al., 2005; Yu et al., 2005). Après decapping, l'ARN clivé est dégradé de façon processive par l'exonucléase Xrn1 dans le sens 5'-3' (Muhlrad et al., 1994).

(c) L'exosome et la dégradation dans le sens 3'-5'

Après l'étape de déadénylation, la dégradation dans le sens 3'→5' est réalisée par l'exosome cytoplasmique, un complexe constitué d'un assemblage multimérique de 6 exonucléases 3'-5' (RRP41, RRP42, RRP45, RRP46, Mtr3 et OIP2) et du complexe Ski (SuperKiller) (Lykke-Andersen et al., 2011). L'exosome est recruté sur l'ARNm qu'il va digérer de 3' en 5'. Le complexe Ski se compose de plusieurs protéines dont 3 sont associées sous forme de trimère : Ski2, Ski3 et Ski8. Le complexe Ski est composé d'ARN hélicases qui permettent le déroulement de l'ARN avant sa digestion et jouerait donc un rôle clef dans la régulation de l'activité de l'exosome (Anderson and Parker, 1998; Brown et al., 2000). La dégradation de l'ARNm s'achève avec la libération de la coiffe libre ou liée à quelques nucléotides, qui sera alors digérée par l'enzyme de clivage de la coiffe Dcp Scavenger (DcpS) (Liu et al., 2002). Comme nous le verrons dans la section I. C. 4, l'exosome et le complexe Ski sont également impliqués dans la détection et la dégradation des ARN aberrants.

Il faut préciser qu'il existe également un exosome nucléaire, impliqué dans les mécanismes de maturation des ARN non codants et la dégradation des pré-ARNm aberrants qui résultent d'un défaut de maturation, d'épissage ou d'export. Il permet aussi la dégradation des ARNm ayant des mutations dans leur séquence codante par un processus connu de dégradation des ARN dans le noyau (Bousquet-Antonelli et al., 2000; Das et al., 2006, 2003; Libri et al., 2002; Torchet et al., 2002).

2) Dégradation indépendante de la déadénylation

(a) Clivage endonucléolytique

Le clivage endonucléolytique apparaît comme le mécanisme de dégradation le plus efficace, générant deux fragments dégradables par les exonucléases (Chernokalskaya et al., 1998; Gallouzi et al., 1998; Ioannidis et al., 1996; Rodgers et al., 2002). Cette dégradation est réalisée par des endonucléases telles que IRE1, PMR1 et la RNase MRP, qui sont spécifiques de certaines séquences situées à l'intérieur du transcrit. Ce mécanisme a été initialement mis en évidence par la présence de fragments 5' et 3' libres *in vivo* de certains transcrits comme celui du récepteur à la Transferrine (TfR) (Binder et al., 1994), de la vitellogénine (Cunningham et al., 2000), de l'IGF II (van Dijk et al., 2001) ou encore celui de la β -globine du xénope (Bremer et al., 2003) suggérant un clivage interne de l'ARNm. Cette coupure endonucléolytique donne naissance à 2 fragments d'ARN aux extrémités 5' et 3' libres,

reconnus alors comme des ARNm non coiffés (extrémité 3') ou non polyadénylés (extrémité 5'), pris en charge respectivement par l'exonucléase Xrn1 et par l'exosome cytoplasmique entraînant la digestion rapide des produits de ce clivage.

(b) Decapping indépendant de la déadénylation

Bien que la plupart des ARNm soit dégradée de façon dépendante de la déadénylation, plusieurs exceptions ont été décrites chez la levure. Ainsi les ARNm *RPS28B* et *EDC1* s'avèrent subir un processus de decapping et de dégradation en absence de déadénylation (figure 11B). La protéine Rps28B est capable de se lier directement à la région non traduite en 3' (3'UTR) de son propre ARNm et de recruter Edc3, une sous-unité du complexe Lsm1-7 qui active le decapping (Badis et al., 2004). Un autre exemple concerne l'ARNm *EDC1* qui code pour une protéine stimulatrice du decapping. Sa déadénylation est inhibée à cause d'une structure secondaire formée suite à l'appariement entre la queue poly(A) et une séquence poly(U) présente dans la région 3'UTR de l'ARNm, et sa dégradation s'avère dépendre uniquement du decapping (Muhlrads and Parker, 2005). Bien que n'ayant pas été décrit chez les mammifères, ces mécanismes démontrent l'importance du decapping dans le processus de dégradation.

Par ailleurs, des travaux récents chez *Schizosaccharomyces pombe* ont permis d'identifier un nouveau mécanisme de dégradation indépendante de la déadénylation, basé sur l'uridylation de l'ARNm (Norbury, 2010). Ce processus implique l'enzyme Cid1, une ARN uridyltransferase cytoplasmique, qui catalyse l'ajout de résidus Uridine en aval de la queue poly(A), pour induire la dégradation de l'ARNm. L'accumulation d'ARN uridylés dans les souches déficientes pour Lsm1 suggère l'implication du complexe Lsm1-7 dans la détection des séquences poly(U) et le recrutement de la machinerie de decapping. Bien qu'absent chez *S. cerevisiae*, ce processus est également observé chez *Aspergillus nidulans*, et des homologues de Cid1 sont présents chez les métazoaires (Morozov et al., 2010; Rissland and Norbury, 2009).

3) Surveillance nucléaire des ARNm aberrants

La plupart des transcrits s'avère être dégradée dans le cytoplasme après leur traduction. Toutefois, les ARNm présentant des erreurs lors des processus de transcription, maturation et export sont dégradés dans le noyau. Ce phénomène a surtout été étudié chez la levure *S. cerevisiae*. Ainsi lors de défauts d'export, les ARN retenus dans le noyau sont éliminés par les

deux voies de dégradation 5'-3' et 3'-5', le choix du mécanisme semble dépendre de l'ARN. Les ARN pré-messagers non-épissés ou présentant des défauts de polyadénylation sont rapidement éliminés par l'exosome nucléaire (Bousquet-Antonelli et al., 2000; Das et al., 2006, 2003; Libri et al., 2002; Torchet et al., 2002). Comme dans le cytoplasme, cette voie de dégradation 3'-5' nucléaire requiert un complexe Lsm nucléaire (Lsm2-8) pour le decapping de l'ARN, ainsi que l'exonucléase 5'-3' Rat1, homologue de Xrn1 (Kufel et al., 2004). Concernant la déadénylation des ARN aberrants dans le noyau, la machinerie enzymatique demeure assez mal connue. Des travaux ont montré qu'elle s'avère différente de la déadénylation cytoplasmique dans la mesure où elle est plus processive et impliquerait chez la levure le complexe CCR4-NOT (Assenholt et al., 2011a), et chez l'humain un complexe CCR4-NOT non conventionnel contenant des déadénylases spécifiques du noyau hCCR4d et hCAF1z (Wagner et al., 2007).

Par ailleurs chez la levure, la dégradation de certains ARN nucléaires requiert le complexe enzymatique de polyadénylation TRAMP (Trf4/5-Air1/2-Mtr4). Paradoxalement dans ce cas, la polyadénylation n'est plus une marque protectrice mais un signal de recrutement de l'exosome nucléaire qui induit la dégradation rapide de l'ARN (LaCava et al., 2005; Wyers et al., 2005).

4) Surveillance cytoplasmique des ARNm aberrants

Les cellules eucaryotes ont développé des systèmes de surveillance qui assurent le « contrôle qualité » des ARNm et conduisent à l'élimination des transcrits aberrants en utilisant les mêmes nucléases que celles impliquées dans la dégradation normale des ARNm. Plusieurs types de défauts peuvent toucher les ARNm. Tout d'abord, ils peuvent présenter un codon stop prématuré (PTC : Premature Termination Codon) qui peut conduire à la production de protéines tronquées. Les PTC peuvent survenir suite à des mutations dites « non-sens », des erreurs de transcription/maturation ou d'initiation de la traduction. Dans ce cas, la principale stratégie utilisée par la cellule est de détecter l'anomalie lors de la traduction et de dégrader les ARNm présentant un PTC par la voie NMD (Nonsense Mediated Decay). Cette voie est retrouvée chez tous les eucaryotes et fait intervenir les protéines UPF1, UPF2 et UPF3 (UP-Frameshift) (Graille and Séraphin, 2012). Chez les mammifères, la détection du PTC fait intervenir le complexe EJC. Cette marque résiduelle d'épissage est habituellement déplacée par le ribosome lors de la traduction, mais reste associée à l'ARNm en présence d'un PTC (Le Hir et al., 2001; Singh et al., 2007). Ce blocage est détecté par la machinerie de surveillance (figure 12). Chez la levure et *D. melanogaster*, la détection du PTC ne semble pas impliquée

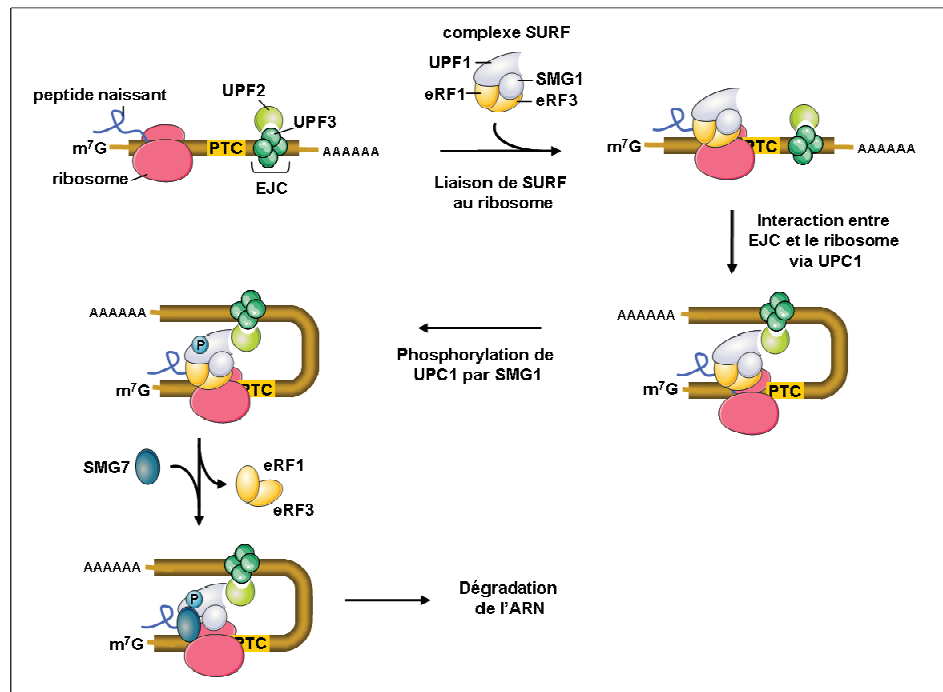


Figure 12 : Mécanisme de surveillance des ARNm aberrants par la voie NMD. Lors de l'épissage, le complexe EJC est déposé sur l'ARN. Il contient UPF3, un acteur de la voie NMD. Dans le cytoplasme, UPF2, une autre protéine de la voie NMD, s'associe à UPF3. Pendant la traduction, la présence d'un codon stop prématuré (PTC) bloque l'action du ribosome, ce qui induit le recrutement du complexe SURF sur le ribosome via l'interaction entre UPF1 et UPF2. SMG1 phosphoryle UPF1, activant l'exclusion du dimère eRF1-eRF3 et la liaison de l'adaptateur SMG7. Bien que les étapes ultérieures soient encore mal comprises, SMG7 semble être requis pour le recrutement de la machinerie de dégradation.

le complexe EJC, mais plutôt la distance entre le PTC et la queue poly(A) qui induit une conformation de l'ARNm reconnue comme anormale (Gatfield et al., 2003; Wen and Brogna, 2010). Dans chaque situation, le ribosome bloqué recrute le complexe SURF, composé d'UPF1 lié à la kinase SMG1 et aux facteurs de terminaison eRF1-eRF3. UPF1 s'associe à la sous-unité UPF2 du complexe EJC situé en aval du PTC. La formation d'un complexe entre SURF et EJC induit la phosphorylation d'UPF1 par SMG1 et active le départ d'eRF1-eRF3. Le facteur SMG7 s'associe alors avec ce complexe et recrute la machinerie de dégradation des ARNm par la voie 5'-3' ou 3'-5' (Jonas et al., 2013; Kashima et al., 2006; Lejeune et al., 2003; Mitchell and Tollervey, 2003; Ohnishi et al., 2003).

D'autre part, les ARNm peuvent être dépourvus de codon stop, induisant la dissociation de PABP de l'ARN, la traduction de la queue poly(A), et le blocage du ribosome sur le transcrit. Cette situation conduit à la dégradation de l'ARNm par la voie NSD (Non Stop Decay), conservée chez tous les eucaryotes (figure 13A). Le modèle mécanistique de cette voie implique le recrutement sur le ribosome bloqué du facteur Ski7, qui se lie à l'exosome pour induire la dégradation de l'ARNm (Frischmeyer et al., 2002; Inada and Aiba, 2005; van Hoof et al., 2002).

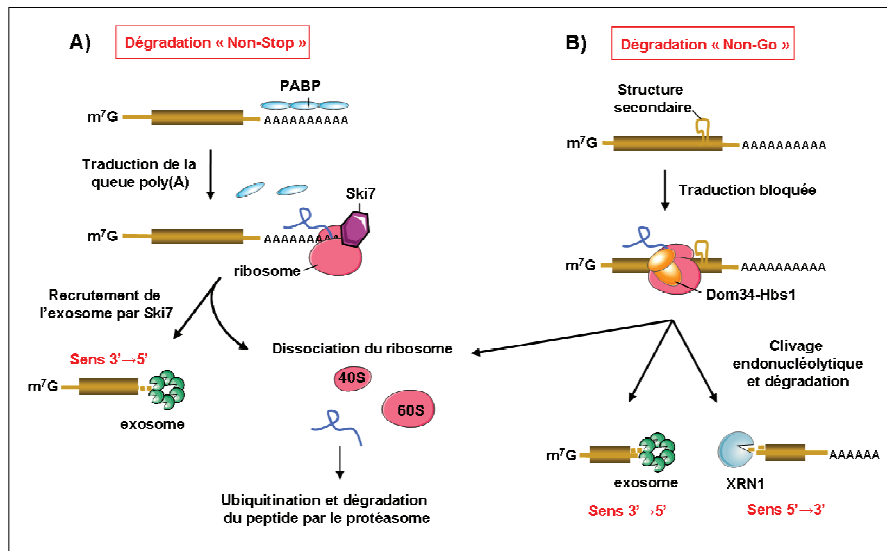


Figure 13 : Mécanismes de surveillance des ARNm aberrants (suite). A) La dégradation « Non-Stop »: la traduction d'un ARNm ne possédant pas de codon stop résulte en la traduction de la queue poly(A), la dissociation de PABP et le blocage du ribosome sur l'ARN. Le facteur Ski7 est alors recruté sur le ribosome bloqué et induit l'association de l'ARN avec l'exosome. Le ribosome est dissocié et le peptide néosynthétisé est ubiquitiné et dégradé par le protéasome. B) La dégradation « No-Go » : la voie s'active lors du blocage du ribosome en cours de traduction suite à la présence de structures secondaires très stables sur l'ARNm. Le ribosome bloqué recrute alors les endonucléases Dom34 et Hbs1 qui clivent l'ARN endonucléolytiquement, induisant sa dégradation par les voies 5'-3' et 3'-5'. Le peptide généré est dégradé par le protéasome.

Une dernière voie a été décrite chez la levure, la voie NGD (No-Go Decay), qui correspond à un mécanisme de détection et de dégradation lorsque le ribosome est bloqué sur l'ARNm en cours de traduction suite à la présence d'une structure secondaire très stable sur l'ARN (figure 13B). Le ribosome bloqué s'associe alors avec les endoribonucléases Dom34 et Hbs1, qui catalysent le clivage endonucléolytique de l'ARN aberrant et sa dégradation par l'exosome et XRN1 (Doma and Parker, 2006).

5) Régulation de la stabilité des ARNm

40 à 50% des changements d'expression génique se produisant en réponse à des signaux cellulaires sont la conséquence d'une modification directe de la stabilité de l'ARNm (Cheadle et al., 2005; Fan et al., 2002). Ces changements sont induits par des altérations de la composition de la particule mRNP qui activent ou inhibent la dégradation du transcrit. Les déterminants de la stabilité sont retrouvés principalement au niveau de la région non traduite en 3' (3'UTR) de l'ARNm. L'un des mécanismes les plus étudiés concerne les éléments riches en Adénosine-Uridine (ARE : AU-Rich Element). Les séquences ARE sont présentes dans la région 3'UTR d'ARNm ayant une demi-vie courte, codant généralement pour des

cytokines, des proto-oncogènes et des facteurs de transcription (Caput et al., 1986; Shaw and Kamen, 1986). L'instabilité que confèrent les ARE à l'ARNm est due aux facteurs se liant spécifiquement sur ces séquences tels que TTP (tristetraproline), AUF1 (AU-Rich binding Factor 1) et KSRP (KH Splicing Regulatory Protein) (Lai et al., 2003; Lal et al., 2004; Linker et al., 2005; Lykke-Andersen and Wagner, 2005). La clé de l'effet déstabilisateur vient de la capacité des ARE et des protéines s'y fixant à recruter la machinerie de dégradation des ARN. L'exosome présente en effet une forte affinité à la fois pour les ARE et pour AUF1. De même, TTP interagit avec l'exosome, la machinerie de decapping et le complexe de déadénylation CCR4-NOT (Brooks and Blackshear, 2013). De nombreuses études se sont focalisées sur l'identification des facteurs se liant aux ARE et comment ces interactions sont modulées en réponse à des signaux cellulaires. Par exemple, la voie p38 MAPK, qui s'active en réponse à de multiples stress, module la phosphorylation de KSRP et TTP, influençant ainsi leur capacité s'associer avec les ARE et à recruter la machinerie de dégradation (Briata et al., 2005; Sun et al., 2007). Récemment, un nouveau type de séquence déstabilisatrice appelé CDE (Constitutive Decay Element) a été identifié dans la région 3'UTR des ARNm codant pour des cytokines pro-inflammatoires (TNF α) chez les mammifères. Le motif CDE forme une structure secondaire en épingle à cheveux reconnue par les facteurs Roquin-1 et Roquin-2, qui recrutent le complexe CCR4-NOT afin d'activer la déadénylation des ARNm. Ce mécanisme permet de limiter la production de TNF α par les macrophages (Leppek et al., 2013).

De nouvelles techniques telles le HITS-CLIP (High-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation) et le PAR-CLIP (Photoactivatable-Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation) ont été mises au point pour décrypter à l'échelle globale la cartographie et la dynamique des interactions entre ARNm et RBP. Ces nouvelles approches combinent des techniques d'immunoprécipitation des mRNP, le séquençage haut-débit des ARNm et d'analyse en spectrométrie de masse des RBP associées (Hafner et al., 2010; Zhang and Darnell, 2011). Ce type d'étude a déjà permis de répertorier plus de 800 RBP distinctes et de cartographier leurs sites de liaison aux ARNm dans la lignée cellulaire humaine HeLa. Les recherches actuelles se focalisent sur l'étude de la dynamique de ces interactions en réponse à divers stimuli cellulaires (changements métaboliques, différentes formes de stress, différenciation, etc.) et leur implication dans le contrôle de la stabilité du transcrit (Castello et al., 2012; Freeberg et al., 2013).

De manière globale, la modulation de la stabilité d'un ARNm s'avère donc être un point crucial de l'expression d'un gène. De sa synthèse jusqu'à sa dégradation, l'abondance des transcrits est ainsi finement de multiples mécanismes. La partie suivante se focalise sur l'implication des ARN non codants dans les différents niveaux de régulation des ARNm, et notamment leur dégradation.

D. Régulation de l'expression par les ARN non codants

Chez les eucaryotes, il existe plusieurs types d'ARN non codants qui possèdent des fonctions diverses et cruciales pour l'expression des gènes (Kapranov et al., 2007). On distingue :

- les ARN ribosomiques (ARNr), il en existe quatre types : les ARNr 18S, 5,8S, 28S qui sont transcrits par l'ARN polymérase I, et les ARNr 5S, synthétisés par l'ARN polymérase III. Ces ARNr sont modifiés et maturés par clivages endo et exonucléolytiques dans le noyau au sein du nucléole pour les ARNr 18S, 5,8S, 28S et dans le nucléoplasme pour les ARNr 5S. Ils sont ensuite assemblés avec différentes protéines ribosomales afin de former la sous unité 60S du ribosome pour les ARNr 28S, 5,8S et 5S et la sous unité 40S pour les ARNr 18S (Venema and Tollervey, 1999).

- les ARN de transfert (ARNt) : synthétisés par l'ARN polymérase III et maturés par l'exosome, les ARNt sont indispensables à la traduction, servant d'adaptateurs reconnaissant le codon et apportant l'acide aminé adéquat avant l'assemblage sur la chaîne polypeptidique (Simos and Hurt, 1999).

- les petits ARN nucléaires (snARN) et nucléolaires (snoARN) : majoritairement synthétisés par l'ARN polymérase II, ils interviennent respectivement dans le processus d'épissage et la maturation des ARNr (Filipowicz and Pogacić, 2002; Will and Lührmann, 2001).

- les ARN non codants (ncARN) : ils sont arbitrairement divisés en petits ARN, typiquement de 20 à 200 nucléotides, et en longs ARN de 200 nucléotides à 100 kb (long ncARN). Leur transcription est assurée par l'ARN polymérase II, suggérant une expression bien plus ubiquitaire que ce qui avait été proposé dans les modèles initiaux. De nombreuses études montrent aujourd'hui l'importance des ARN non codants dans la régulation globale de l'expression des gènes. Les paragraphes suivants se focalisent sur leur biogenèse et leur mécanisme d'action.

1) Les petits ARN non codants

Les espèces animales expriment trois types de petits ARN non codants : les microARN (miARN), les petits ARN interférant (siARN) et les ARN interagissant avec PIWI (piARN) (Moazed, 2009). Ces petits ARN sont classés en fonction de leurs origines, de leur type de biogenèse/maturation et de leur interaction avec la famille Argonaute. En effet les piARN sont générés à partir de précurseurs simple-brin, indépendamment des enzymes RNases III qui sont par contre nécessaires à la biogenèse des miARN et siARN. Concernant leur interaction avec la famille Argonaute, les miARN et siARN s'associent aux facteurs de la sous-famille AGO alors que les piARN sont pris en charge par la sous-famille PIWI. Concernant leur taille, les piARN mesurent généralement 24-32 nucléotides de long, contre 20-23 nucléotides pour les miARN et siARN. Les petits ARN non codants régulent négativement l'expression des gènes et sont à la base du concept de l'interférence ARN, dont le prix Nobel de médecine 2006 a récompensé les découvreurs G. Mello et A. Fire.

(a) Les siARN

Les siARN, de 21 à 23 nucléotides, décrits comme des défenseurs de l'intégrité du génome, sont issus du clivage cytoplasmique, par Dicer, de longs ARN double brin provenant de la transcription bidirectionnelle de gènes, de transposons ou de virus à génome à ARN double-brin. Dicer est une endoribonucléase très conservée qui appartient à la famille des RNase III et qui permet le clivage des ARN double-brin (endogènes ou exogènes) conduisant ainsi à la production de petits ARN flanqués de 2 nucléotides protubérant à l'extrémité 3' (Colmenares et al., 2007; Pak and Fire, 2007) (figure 14). En fonction des espèces, il existe plusieurs homologues de Dicer possédant des rôles distincts (Lee et al., 2004; Xie et al., 2004). Par exemple, chez *D. melanogaster*, Dicer 1 participe à la biogénèse des miARN alors que Dicer 2 joue un rôle dans la production des siARN (Tomari et al., 2007).

Après clivage par Dicer, l'un des deux brins du siARN est incorporé dans le complexe siRISC (siRNA-induced silencing complex) pour servir de guide jusqu'à l'ARN messager de séquence homologue tandis que l'autre brin est dégradé. La sélection du brin guide semble être déterminée par une asymétrie thermodynamique de l'ARNm double brin, le brin le moins stable à son extrémité 5' étant celui qui est chargé au sein du complexe siRISC (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). Le complexe siRISC est un complexe multiprotéique composé de Dicer, TRBP (transactivation-response element RNA-binding protein), sa principale protéine catalytique AGO2 et du siARN guide. Chez les mammifères il existe 4

protéines AGO (AGO1-AGO4) mais seule AGO2 possède une activité endonucléase (Meister et al., 2004). Cette protéine contient 4 domaines : N-terminal, PAZ, MID, PIWI. Le domaine PAZ permet la liaison de AGO2 à l'extrémité 3' du siARN guide (J. Liu et al., 2004; Ma et al., 2005; Parker et al., 2005; Song et al., 2004, 2003).

Après appariement entre le siARN guide et l'ARNm complémentaire, l'activité endoribonucléase du complexe siRISC catalyse le clivage de l'ARNm, notamment par le domaine PIWI de la protéine Argonaute (J. Liu et al., 2004; Song et al., 2004; Tuschl et al., 1999; Zamore et al., 2000). Le complexe RISC est ensuite recyclé et l'ARNm cible est dégradé par des exonucléases cellulaires (Orban and Izaurralde, 2005). En parallèle de la répression post-transcriptionnelle, les siARN peuvent réduire la transcription d'un ARNm en activant la formation d'hétérochromatine (figure 15). Cette observation est à la base du concept de répression génique co-transcriptionnelle (CTGS : co-transcriptional gene silencing) découvert chez *Schizosacchomyces pombe* (Castel and Martienssen, 2013). Il a ainsi été décrit lors de l'élongation de la transcription que Ago1, guidé par son siARN jusqu'au transcrit naissant, inhibe l'ARN pol II *via* un mécanisme non élucidé. Ce complexe siRISC nucléaire (également appelé siRITSC : siRNA-induced transcription silencing complex) contient le facteur Chp1, qui permet au complexe de s'associer à la chromatine *via* un chromodomaine, et CLRC (Cryptic Loci Regulator Complex) qui catalyse la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3. Cette modification permet le recrutement de Swi6, l'orthologue de HP1 (Heterochromatin Protein 1) qui induit la formation d'hétérochromatine au niveau du locus ciblé (Verdel et al., 2004; Volpe et al., 2002; Zaratiegui et al., 2011; Zhang et al., 2008). Chez la plante *Arabidopsis thaliana*, un mécanisme analogue de CTGS a été décrit,

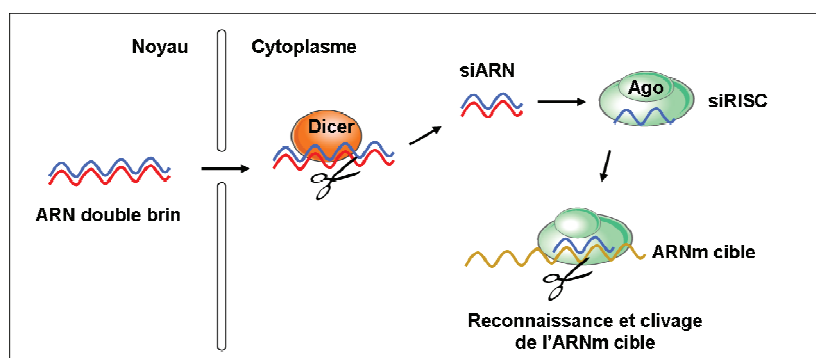


Figure 14: Biogénèse et mécanisme de l'ARN interférence. L'ARN double brin est clivé par l'enzyme Dicer. Il est ensuite pris en charge par le complexe siRISC où l'un des deux brins seulement va servir de guide jusqu'à l'ARNm de séquence homologue tandis que l'autre brin est dégradé. L'appariement entre le brin guide et l'ARNm complémentaire entraîne le clivage de l'ARNm cible par le complexe siRISC suivi de sa dégradation.

impliquant le complexe siRITSC dans l'activation de la méthylation des cytosines de l'ADN ciblé (Aufsatz et al., 2002; Mette et al., 2000). Le mécanisme de répression CTGS a été retrouvé chez de nombreuses espèces de la levure jusqu'aux mammifères (Castel and Martienssen, 2013).

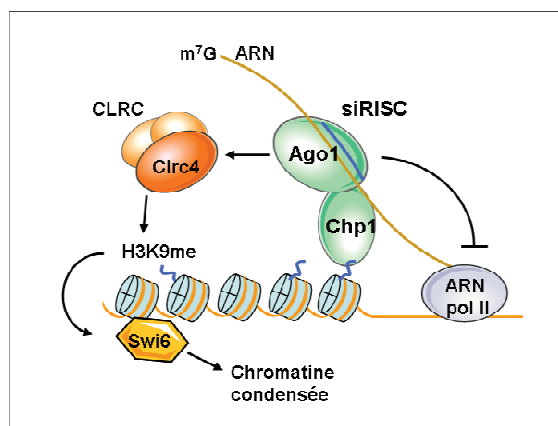


Figure 15 : Modèle de répression co-transcriptionnelle par les siARN chez *Schizosaccharomyces pombe*. Le complexe siRISC associé à l'ARN cible naissant inhibe l'ARN pol II, interagit avec la chromatine *via* le facteur Chp1, et recrute le complexe CLRC. CLRC méthyle la lysine 9 de l'histone H3, ce qui induit l'association de Swi6/HP1 avec les nucléosomes et induit la formation d'hétérochromatine.

(b) Les miARN

Les microARN (miARN) sont de petits ARN non codants retrouvés chez tous les eucaryotes. Les miARN sont en majorité transcrits par l'ARN polymérase II à partir de séquences endogènes situées dans les introns des ARN pré-messagers ou dans d'autres régions du génome. Les miARN qui régulent environ 60% des gènes codants des protéines sont phylogénétiquement bien conservés (Friedman et al., 2009; Lewis et al., 2005). Leur biogenèse débute avec la synthèse de précurseurs simple-brin repliés en « épingle à cheveux » par complémentarité incomplète (Bartel, 2009). Ces molécules primaires, dites pri-miARN, possèdent comme les ARNm une coiffe et une queue poly(A) (figure 16). Drosha, une endonucléase RNase III, et son partenaire DGCR8 se lient à ce pri-miARN dans le noyau pour le cliver et générer un miARN d'environ 70 nucléotides, dit miARN précurseur (pré-miARN) (Basyuk et al., 2003; Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004; Han et al., 2004; Landthaler et al., 2004; Lee et al., 2003; Zeng and Cullen, 2003). Le pré-miARN est alors exporté dans le cytoplasme *via* l'Exportine 5 où il est clivé par Dicer en un miARN mature, d'environ 21 nucléotides. Comme pour les siARN, un seul des deux brins du miARN mature est chargé dans le complexe RISC et sert de guide jusqu'à une séquence complémentaire. Le

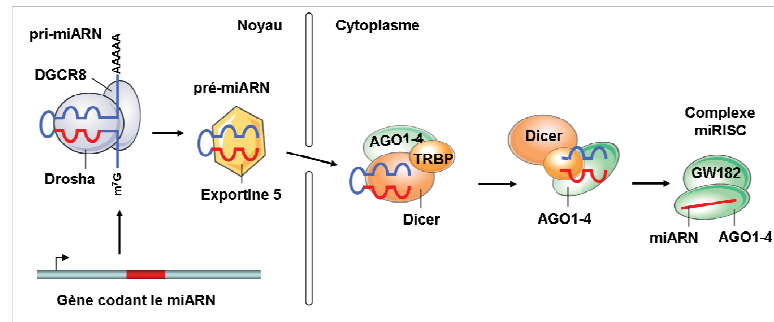


Figure 16 : Biogénèse des miRNA. Le pri-miRNA est dans un premier temps clivé en pré-mRNA par le complexe Droscha/DGCR8 dans le noyau puis est exporté par l'exportine 5 dans le cytoplasme où il va être maturé par Dicer en miRNA. Un seul des deux brins est chargé dans le complexe RISC et sert de guide jusqu'à la séquence complémentaire.

brin non utilisé est séparé du brin fonctionnel par un mécanisme non encore élucidé semblant mettre en jeu une activité hélicase, puis dégradé (Lund et al., 2004).

Les miARN régulent négativement l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel en s'appariant entièrement ou partiellement à des séquences complémentaires situées dans les régions 3'UTR des ARNm. Cette répression est la conséquence du recrutement sur l'ARNm du complexe miRISC (miRNA-induced silencing complex), un complexe ribonucléoprotéique composé du miARN chargé sur la protéine Argonaute et du facteur GW182. Le mécanisme de répression utilisé par la machinerie des miARN implique à la fois l'inhibition de la traduction et l'activation de la dégradation de l'ARNm. (Eulalio et al., 2008a)

Plusieurs modèles ont été proposés concernant le mécanisme d'action des microARN. D'une part, l'action des miARN consisterait en une inhibition de l'initiation de la traduction qui met en jeu la coiffe en 5' du transcrit. Plusieurs études ont ainsi montré que la protéine Ago2 *via* un motif particulier (MID domain) est capable d'interagir directement avec la coiffe en 5' et empêcherait le recrutement du facteur d'initiation de la traduction eIF4E (Djuranovic et al., 2012; Kiriakidou et al., 2007). Les miARN peuvent également inhiber l'assemblage de la sous-unité 60S du ribosome avec la sous-unité 40S conduisant à l'inhibition de la traduction. (Chendrimada et al., 2007; Wang et al., 2008). D'autre part, les miARN ont été impliqués dans la déstabilisation directe de l'ARNm par déadénylation, decapping et clivage exonucléotique. Ce mécanisme requiert GW182, les enzymes de clivage de la coiffe (Dcp1/Dcp2) et celles de déadénylation (complexe CCR4-NOT) (Behm-Ansmant et al., 2006; Eulalio et al., 2009b; Rehwinkel et al., 2005). Il existe une protéine GW182 chez la Drosophile et 3 paralogues chez les mammifères : TNRC6A, TNRC6B, TNRC6C (trinucleotide repeat containing). Ces protéines interagissent directement avec les protéines Agonautes, sont capables de se lier à l'ARNm et sont directement impliquées dans la

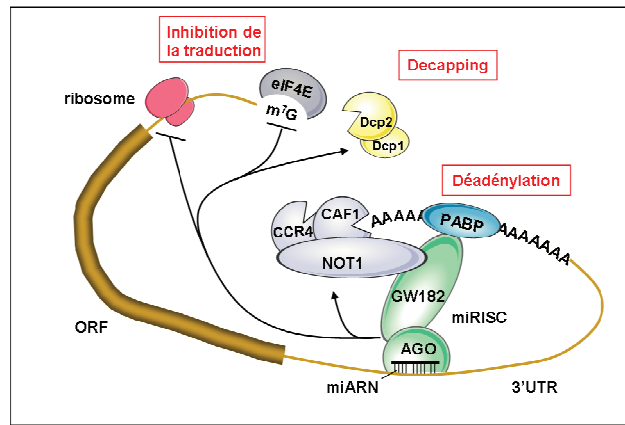


Figure 17 : Mécanismes de répression post-transcriptionnelle par la machinerie des miARN. Après appariement entre le miARN et son ARNm cible, le complexe miRISC inhibe l'initiation et l'élongation de la traduction en interférant avec la reconnaissance de la coiffe par eIF4E. miRISC active également la déadénylation de l'ARNm via le recrutement du complexe CCR4-NOT, et induisant par conséquent le decapping.

répression et la dégradation des ARNm par les miARN (Eulalio et al., 2009a, 2009b, 2008b). Le modèle d'action actuel du miRISC repose sur l'interaction du facteur GW182 avec les complexes de déadénylation PAN2-PAN3 et CCR4-NOT (figure 17). En particulier, le recrutement du complexe CCR4-NOT sur l'ARNm semble être responsable du départ de PABP de la queue poly(A), la rendant accessible à la dégradation, et inhibant son interaction avec la coiffe et donc la circularisation de l'ARNm. La répression traductionnelle serait la conséquence de cet effet de déstabilisation de la particule mRNP (Behm-Ansmant et al., 2006; Huntzinger et al., 2013; Zekri et al., 2013).

(c) Les piARN

Cette classe d'ARN est présente chez *D. melanogaster*, *C. elegans* et les mammifères, et n'est pas retrouvée chez les plantes et les champignons (Ishizu et al., 2012). Les piARN sont synthétisés à partir d'éléments intergéniques répétés appelés clusters piARN et essentiellement composés d'ADN répété et d'éléments transposables. Les piARN, sont particulièrement exprimés dans les gonades et la lignée germinale et sont enrichis en séquences antisens de transposons. Cette caractéristique est à l'origine de leur implication dans les mécanismes de répression de la transposition des éléments transposables, protégeant ainsi l'intégrité du génome dans la lignée germinale (Saito et al., 2006; Sarot et al., 2004; Svoboda et al., 2004; Vagin et al., 2006; Watanabe et al., 2006). La biogénèse des piARN démarre par un processus appelé le cycle « ping-pong », initialement décrit dans la lignée germinale de drosophile (Brennecke et al., 2007; Gunawardane et al., 2007). Les clusters piARN sont d'abord transcrits pour générer des précurseurs piARN primaires. Dans le

cytoplasme, un mécanisme mal connu induit leur maturation en petits piARN antisens de 23-29 nucléotides enrichis en uridine à l'extrémité 5'. Ce petit ARN simple-brin est alors chargé sur les facteurs de la famille Argonaute : Aubergine (AUB) et PIWI, qui vont cibler les ARNm des transposons dans le cytoplasme pour les cliver. Cette étape génère des piARN sens présentant un enrichissement en adénosine en position 10, que le facteur AGO3 prend en charge pour cibler et cliver les précurseurs piARN primaires, amplifiant le nombre de piARN « antisens » et mettant fin au cycle ping-pong.

Des travaux réalisés chez la drosophile ont révélé le rôle des piARN dans la répression de l'expression génique au niveau post-transcriptionnel, *via* la dégradation des ARNm (Nishida et al., 2007). En effet, la machinerie des piARN est détectée au sein de structures cytoplasmiques, co-localisant avec les transcrits des rétrotransposons et des membres de la machinerie de dégradation des ARNm tels que DCP1/2, XRN1 et SKI3. Les mutants *aub*, déficients pour la production des piARN, présentent une augmentation de la stabilité des ARNm des rétrotransposons, indiquant une répression post-transcriptionnelle des transposons dépendante des piARN (Lim et al., 2009). Par ailleurs dans l'embryon précoce de drosophile, AUB forme un complexe avec SMAUG, la déadénylase CCR4, l'ARNm Nanos et des piARN ciblant la région 3'UTR de Nanos, suggérant un rôle des piARN dans la dégradation dépendante de la déadénylation d'ARNm (Rouget et al., 2010).

Il a été montré en parallèle que la machinerie piARN est recrutée au niveau chromatinien sur les gènes des transposons ciblés par les piARN afin d'inhiber leur expression en augmentant la formation d'hétérochromatine et les modifications répressives des histones telles H3K9me3 (voie CTGS) (Brower-Toland et al., 2007; Le Thomas et al., 2013).

2) Les longs ARN non codants

De récentes avancées dans le domaine de la génomique ont révélé l'existence d'un grand nombre de transcrits ne codant pour aucune protéine (Carninci et al., 2005; Djebali et al., 2012). Ces longs ARN non-codant (lncARN) sont transcrits aussi bien à partir des espaces intergéniques que des régions codantes, et leur expression s'avère souvent être régulée en fonction des stades du développement (Mercer et al., 2009). Initialement les lncARN étaient considérés comme des sous-produits résiduels résultant d'ARN polymérases de faible fidélité (Struhl, 2007). Depuis quelques années, leur rôle dans la régulation de l'expression des gènes a fait l'objet d'un nombre croissant de publications. Leur fonction a particulièrement été mise en évidence dans les régulations épigénétiques de l'expression des gènes environnants (figure

18). Par exemple, des centaines de lncARN sont séquentiellement exprimées lors du développement embryonnaire contrôlé par les loci humains HOX. HOTAIR est l'un de ces lncARN, antisens du transcrit HOX, qui est capable de réprimer la transcription du locus HOXD en induisant une structure chromatinienne fermée *via* le recrutement du complexe de remodelage PRC2 (Rinn et al., 2007) (figure 18A). Un mécanisme similaire avait initialement été décrit lors de l'inactivation du chromosome X par le lncARN Xist (Ogawa et al., 2008; Zhao et al., 2008). Par ailleurs, d'autres travaux récents ont démontré que les lncARN sont capables de réguler directement le processus d'initiation de la transcription en interagissant avec des facteurs de transcription et en contrôlant négativement ou positivement leur fixation aux promoteurs avoisinants (Feng et al., 2006; Lai et al., 2013; Mercer et al., 2009) (figure 18B).

Des phénomènes de répression transcriptionnelle par interaction du lncARN Alu avec l'ARN pol II ont également été décrits dans les cellules humaines (Mariner et al., 2008). Enfin, au niveau post-transcriptionnel, les lncARN peuvent contrôler la maturation des ARNm, et notamment leur épissage. L'ARNm Zeb2 a ainsi été décrit comme s'hybridant dans le noyau avec un lncARN antisens, ayant pour conséquences de masquer un site d'épissage et donc de

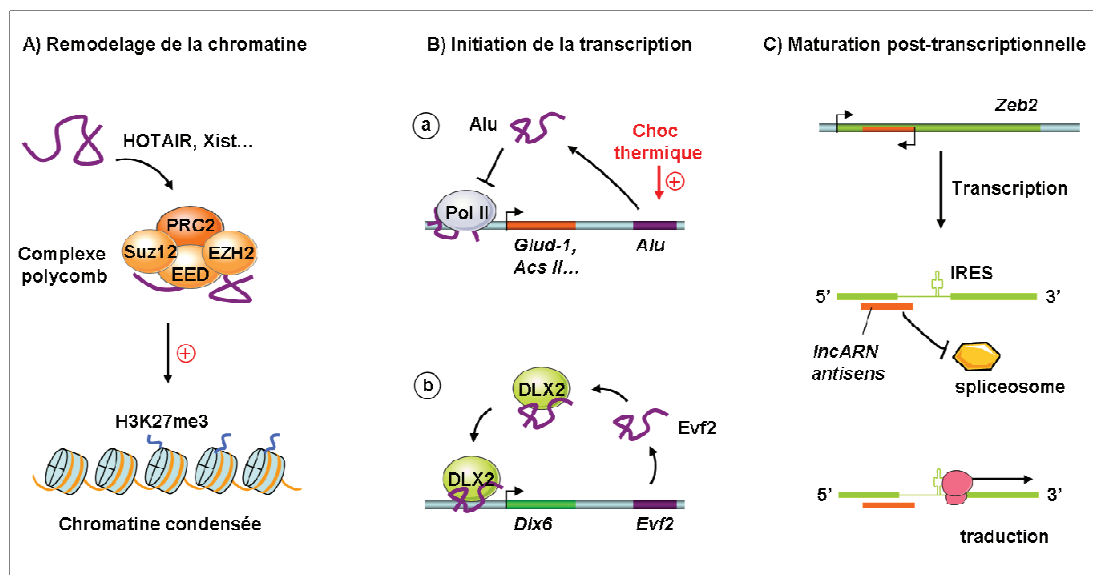


Figure 18 : Modèles de régulations de l'expression des gènes par les lncARN. A) Au niveau d'un promoteur, les lncARN peuvent recruter des complexes de modification de la chromatine. Par exemple, le lncARN HOTAIR recrute le complexe polycomb qui méthyle la lysine 27 de l'Histone H3 et induit la formation d'hétérochromatine. B) Régulation de l'initiation transcriptionnelle par les lncARN. a) Lors d'un stress thermique, le lncARN Alu est transcrit et agit en répresseur transcriptionnel *via* son interaction avec l'ARN pol II. b) Le lncARN Evf2 agit comme un co-activateur transcriptionnel en recrutant le facteur de transcription DLX2 sur le promoteur du gène *Dlx6*. C) L'expression du gène *Zeb2* est régulée par un lncARN antisens qui agit en s'hybridant à l'ARN pré-messager et en masquant un site d'épissage. Il y a alors rétention d'un intron contenant un IRES qui va modifier la traduction de ZEB2.

favoriser l'inclusion d'un intron contenant un IRES (Beltran et al., 2008) (figure 18C). Par conséquent, les lncARN s'avèrent potentiellement capables de réguler les étapes essentielles de l'expression des gènes eucaryotes. L'utilisation de technologies à haut débit telles le séquençage dit « next-generation » devrait permettre de compléter le catalogue des lncARN et de comprendre leur multiplicité fonctionnelle.

E. Régulations spatiales des ARNm

Les divers processus conduisant à la régulation de l'expression des gènes doivent être coordonnés tant dans le temps que dans l'espace. Ainsi, de leur synthèse jusqu'à leur dégradation, les ARN transitent à travers des structures subcellulaires bien distinctes qui vont influencer la composition de la particule mRNP.

1) Compartiments nucléaires

De nombreuses structures nucléaires impliquées dans la maturation des ARN ont déjà été décrites chez les eucaryotes. On distingue principalement

- le nucléole, qui a majoritairement été décrit comme étant le site de synthèse et de maturation des ARN ribosomiaux par l'ARN polymérase III (Boisvert et al., 2007). Dans sa périphérie se situe le compartiment péri-nucléolaire, une structure enrichie en RBP et en ARN polymérase III (Pollock and Huang, 2010).

- les corps de Cajal, qui sont impliqués dans la maturation de petits ARN nucléaires et nucléolaires, eux mêmes nécessaires aux différentes étapes de maturation des ARNm (Cioce and Lamond, 2005). Deux structures associées aux corpuscules de Cajal ont également été décrites : les Gems (Matera and Frey, 1998), qui semblent être impliqués dans la maturation des snRNP, et les corps de clivage, (Schul et al., 1996) qui contiennent les facteurs de clivage et de polyadénylation des ARNm, ainsi que des facteurs de transcription généraux tels que TFIIE et TFIIIF (Li et al., 2006; Schul et al., 1996)

- les corps PML, caractérisés par la présence de la protéine PML (ProMyelotic Leukemia) étant un lieu de stockage, de modifications post-traductionnelles et de dégradation des protéines nucléaires (Bernardi and Pandolfi, 2007)

- les « speckles », ou granules interchromatiniens, qui sont enrichis en facteurs intervenant dans l'épissage des ARNm (Lamond and Spector, 2003), et les « paraspeckles » dont la fonction reste à définir mais qui semble retenir les ARN double brin qui ont été sujet au processus d'édition (Nakagawa and Hirose, 2012).

Bien que la biogénèse de ces compartiments nucléaires reste encore mal connue, plusieurs études récentes ont démontré l'implication des ARN codants et non codants dans la nucléation initiale de ces structures. La plupart des corps nucléaires s'avère en effet s'assembler autour d'un ARN agissant comme une plateforme de recrutement (Mao et al., 2011; Shevtsov and Dundr, 2011).

2) Structures cytoplasmiques

Un aspect essentiel de la régulation de l'expression des gènes se situe dans le cytoplasme. De nombreuses observations ont déjà mis en évidence l'importance de la localisation des ARN pour le contrôle de leur expression (Anderson and Kedersha, 2009). Ainsi en fonction de la composition de la particule mRNP, les ARNm peuvent être présents sous forme de polysomes activement traduits, mais peuvent également s'agréger en granules réprimés au niveau traductionnel et microscopiquement visibles dans le cytoplasme (figure 19).

(a) Les granules de stress

Dans la plupart des cellules eucaryotes, la réponse au stress inhibe l'initiation de la traduction et conduit à la formation d'agrégats ribonucléoprotéiques cytoplasmiques appelés granules de stress. Ils contiennent habituellement les ARNm polyadénylés non traduits, la machinerie d'initiation de la traduction comme les facteurs eIF4, PABP, eIF3 et eIF2, les sous-unités ribosomales 40S et d'autres protéines additionnelles affectant la fonction des ARN (Anderson and Kedersha, 2009; Kedersha et al., 1999; Kimball et al., 2003; Mazroui et al., 2006). Leur formation est induite par des stress (Kedersha et al., 1999), mais également par des drogues bloquant la traduction (Dang et al., 2006; Mazroui et al., 2006; Moka et al., 2009), par l'invalidation de certains facteurs d'initiation ou la surexpression de RBP qui répriment la traduction (De Leeuw et al., 2007; Gilks et al., 2004; Mazroui et al., 2002; Wilczynska et al., 2005).

Dans des conditions de stress, eIF2 α est phosphorylé par diverses kinases, empêchant la formation du complexe ternaire eIF2-GTP-ARNt-Met et bloquant le complexe d'initiation 48S sur l'ARNm (Wek et al., 2006). L'assemblage des granules de stress est alors initié par les protéines TIA1 et TIAR1 qui contribuent à l'arrêt de la traduction et au désassemblage des polysomes et à l'agrégation des mRNP (Gilks et al., 2004; Pullmann et al., 2007). Ces facteurs disposent d'un domaine « Q/N-rich prion-like » qui induit leur auto-agrégation et facilite l'assemblage des granules. D'autres facteurs impliqués dans la traduction et le

métabolisme des ARNm tels que la tristetraproline ou CPEB ont été détectés dans ces granules de stress (Stoecklin et al., 2004; Wilczynska et al., 2005).

La fonction des granules de stress reste encore mal comprise. Bien qu'ils semblent être associés aux mécanismes de répression traductionnelle, de stockage et de stabilisation des ARNm lors d'un stress, leur implication au sein de ces processus n'a toutefois pas été formellement démontrée. Le modèle actuel suppose un rôle des granules de stress dans le remodelage des complexes mRNP (Anderson and Kedersha, 2009; Buchan and Parker, 2009). En effet, en augmentant la concentration locale des facteurs d'initiation de la traduction et de diverses RBP, ces structures permettraient le maintien de la structure et de l'intégrité des complexes mRNP, et pourraient faciliter l'association des ARNm avec la machinerie d'initiation de la traduction lors d'un stress. En accord avec ce modèle, les granules de stress contiennent de nombreux facteurs tels que HuR, Lin28 ou DDX3/Ded1, impliqués dans l'activation traductionnelle dépendante du stress (Buchan and Parker, 2009).

(b) Les P-bodies ou foyers DCP

Un autre type de granules d'ARN bien caractérisé est retrouvé dans le cytoplasme des cellules somatiques : les P-bodies (Processing Bodies) ou foyers DCP. Il s'agit de structures cytoplasmiques dynamiques dans lesquelles s'accumulent les complexes mRNP accompagnés des facteurs impliqués dans la dégradation 5'-3' incluant les enzymes de déadénylation, de decapping (Dcp1p/Dcp2p), ses cofacteurs Dhh1p/RCK/p54, Pat1p, Lsm1p-7p, Edc3p et l'exonucléase Xrn1p (Cougot et al., 2004; Sheth and Parker, 2003), mais également des protéines impliquées dans la surveillance des ARNm (Sheth and Parker, 2006; Unterholzner and Izaurralde, 2004), et la répression traductionnelle (Coller and Parker, 2005; Holmes et al., 2004). Contrairement aux granules de stress, les P-bodies sont observés de façon permanente dans des conditions normales de croissance, à l'exception de la mitose et de la quiescence, processus dans lesquels ils ne sont plus détectés dans les lignées cellulaires humaines (Yang et al., 2004). Bien que les P-Bodies aient été décrits chez tous les eucaryotes, leur composition est, outre les enzymes de decapping, spécifique de chaque organisme. Par exemple, chez les mammifères, les P-bodies incluent des protéines impliquées dans la fonction des miARN, comme Ago2 et GW182 (Jakymiw et al., 2005; Liu et al., 2005; Meister et al., 2005; Sen and Blau, 2005).

L'assemblage des ARNm en P-bodies s'effectue suite à la dissociation des mRNP et des polysomes, aboutissant à l'agrégation des mRNP réprimées. Les machineries de decapping et

de déadénylation s'avèrent être des pré-requis essentiels à la formation de ces granules. En effet, l'inhibition des enzymes de déadénylation telles que CAF1 et CCR4 entraîne la perte de ces corps (Andrei et al., 2005; Zheng et al., 2008). Par ailleurs, de nombreux facteurs d'assemblage des P-bodies présentent des domaines de multimérisation et d'agrégation, tels les facteurs d'assemblage des granules de stress. C'est le cas par exemple de la sous-unité Lsm4 du complexe activateur du decapping Lsm1-7 qui possède un domaine « Q/N-rich prion-like » dont la délétion chez la levure perturbe la formation des P-bodies (Decker et al., 2007; Reijns et al., 2008).

Chez la levure, ces corps cytoplasmiques semblent être des sites où s'effectue le clivage de la coiffe et la dégradation 5'-3' des ARNm (Sheth and Parker, 2003). Chez les mammifères, plusieurs études ont mis en évidence que les P-Bodies sont des centres actifs de dégradation et non des sites de stockages des facteurs de dégradation. Ces structures disparaissent après

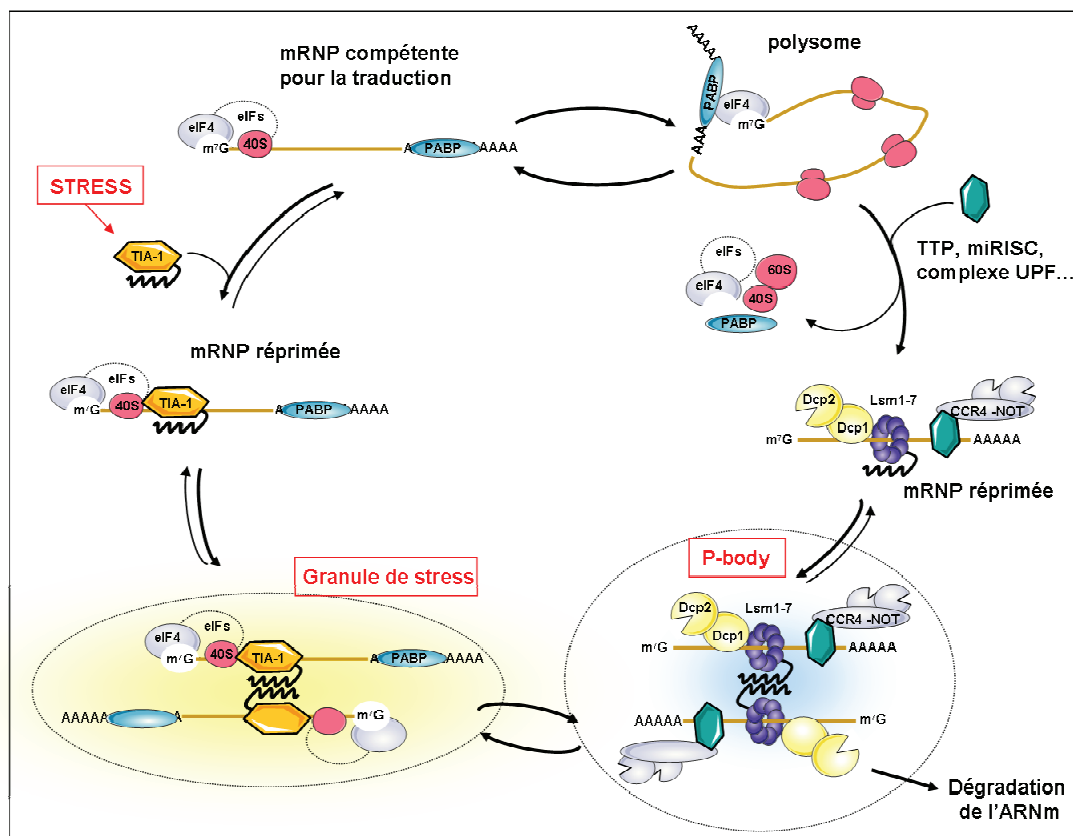


Figure 19 : Modèle d'intégration des granules de Stress et des P-bodies dans le cycle des mRNP (Adapté de Buchan et Parker, 2010). Lors d'un stress, des répresseurs traductionnels tels que TIA-1 sont recrutés sur l'ARNm, inhibent l'initiation de la traduction et induisent l'agrégation des mRNP pour former le granule de stress. De la même façon, lorsque la traduction est compromise suite à l'action d'un répresseur (miRISC, TTP, etc.), les ARNm interagissent avec les composants de la machinerie de la répression et de dégradation des ARNm formant alors des mRNP qui s'agrègent dans les P-Bodies. Ces ARNm peuvent alors être dégradés, stockés dans les P-bodies ou encore sortir des P-bodies pour rentrer à nouveau dans un cycle de traduction en transitant par les granules de stress.

inhibition de la synthèse des ARNm, par traitement des cellules à l'actinomycine D, suggérant que leur assemblage est dépendant de la présence d'ARNm. L'utilisation de cycloheximide, bloquant la traduction et la dégradation des transcrits en séquestrant les ribosomes sur l'ARNm, entraîne également la disparition des foyers indiquant un lien entre la dégradation des ARNm et la présence de ces corps (Cougot et al., 2004; Erickson and Lykke-Andersen, 2011). Par ailleurs, des expériences de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) indiquent que la majorité des mRNP présentes dans les P-Bodies semble être présente de manière transitoire, impliquant soit la dégradation de l'ARNm, soit son retour dans les polysomes (Bhattacharyya et al., 2006; Brengues et al., 2005).

Plusieurs observations ont démontré que les granules de stress interagissent avec les P-bodies. En effet, chez les mammifères, les deux structures s'associent de manière transitoire lors d'un traitement à l'arsenite ou de la surexpression de TTP ou CPEB1 (Kedersha et al., 2005; Mollet et al., 2008; Wilczynska et al., 2005). Ces interactions suggèrent l'existence d'échanges d'ARNm entre les polysomes, les granules de stress et les P-bodies, favorisant le remodelage des particules mRNP et facilitant le tri des ARNm vers le stockage, la dégradation ou le retour à la traduction (Buchan and Parker, 2009).

(c) Le granule polaire ou germinale

Chez certaines espèces de métazoaires, des granules d'ARN sont spécifiquement détectés dans les cellules germinales et présentent des rôles importants dans la gamétogenèse et le développement embryonnaire. Ces structures nommées granules polaires ou germinaux sont observées chez plusieurs espèces, telles que *C. elegans*, *D. melanogaster* et *X. laevis*, et ont été identifiées comme des sites de stockage des ARNm maternels (Gallo et al., 2008; Kloc et al., 2002; Micklem, 1995; Thomson and Lasko, 2004). Chez *D. melanogaster* par exemple, les granules germinaux contiennent des ARNm maternels maintenus dans un état inactif au niveau traductionnel jusqu'à ce qu'ils soient requis pour le développement des cellules germinales (Johnstone and Lasko, 2001). Ces structures contiennent habituellement tous les composants des P-bodies impliqués dans la répression traductionnelle et la fonction des miARN (Thomson et al., 2008). D'un point de vue fonctionnel, les granules germinaux sont à l'origine d'importantes modifications d'expression génique de façon indépendante de l'activation transcriptionnelle. Ces effets semblent être le résultat de la libération dans le cytoplasme des ARN (ARNm maternels, piARN et miARN) associés aux granules et ayant un effet dans la régulation génique pendant l'embryogenèse. De la même façon chez les

mammifères, les spermatides disposent d'un granule d'ARN périnucléaire appelé corps chromatoïde, dont la composition est similaire à celle des P-bodies (Kotaja and Sassone-Corsi, 2007; Kotaja et al., 2006; Nagamori and Sassone-Corsi, 2008). La fonction de cette structure reste encore mal comprise et son rôle dans la modulation épigénétique de l'expression des gènes embryonnaires n'a pas été formellement démontré.

(d) Eléments de localisation et transports des mRNP

En plus de leur localisation dans ces granules, les ARNm peuvent se spatialiser dans la cellule. Ce phénomène a été mis en évidence *via* l'étude de systèmes modèles tels que le bourgeonnement de *S. cerevisiae*, le transport dendritique dans les neurones et l'embryogenèse de drosophile (Marchand et al., 2012). Par exemple, des études à large échelle menées chez la drosophile ont montré que plus de 71% des 3370 ARNm analysés sont localisés dans des compartiments différents à l'intérieur de l'embryon précoce. Cette étude a permis d'identifier plusieurs douzaines de nouveaux granules d'ARN sub-cellulaires dans l'embryon de drosophile (Lécuyer et al., 2007). Ce concept de spatialisation cytoplasmique des mRNP implique la reconnaissance d'éléments de localisation (appelé aussi zipcodes) produits par des structures secondaires dans l'ARNm (Jambhekar and Derisi, 2007). La spatialisation est influencée par plusieurs processus tels que le transport actif des mRNP *via* le cytosquelette et ses protéines moteurs, des phénomènes d'ancrage local, et la stabilisation spatialement sélective de l'ARNm. Un modèle de transport intégrant ces mécanismes concerne l'ARNm *nanos* chez la drosophile, synthétisé par les cellules nourricières et transporté vers l'ovocyte où sa localisation est restreinte au pôle postérieur (Forrest and Gavis, 2003). Dans l'embryon précoce, *nanos* non localisé est déadénylé par le complexe CCR4-NOT et dégradé *via* une voie dépendante des piARN, alors que la fraction postérieure (4%) est transportée au niveau des centrosomes des noyaux des cellules polaires par un processus utilisant les microtubules et la dynéine comme moteur (Lerit and Gavis, 2011; Rouget et al., 2010). Un autre exemple bien caractérisé de transport actif concerne la localisation de l'ARNm ASH1 vers le bourgeon de la levure *S. cerevisiae*. ASH1 est en effet transporté sur les filaments d'actine par Myo4, une protéine moteur de type Myosine V (Bertrand et al., 1998; Long et al., 2000). Des situations similaires ont été décrites dans les neurones de mammifères, lors du processus d'adressage dendritique des mRNP utilisant les dynéines et kinésines comme moteurs le long des microtubules (Dictenberg et al., 2008; Fallini et al., 2011). Cette régulation très fine du trafic et de la spatialisation des ARNm induit

leur traduction localisée à l'intérieur de la cellule, et semble permettre de réguler directement la distribution des protéines dans la cellule.

II. Couplage entre la synthèse et la dégradation des ARNm

A travers cette première partie, il a été mis en lumière combien l'expression d'un gène s'avère être un processus complexe, finement orchestré par un vaste réseau d'interaction entre l'ARNm, des facteurs de liant à l'ARN et des ARN non codant. D'un point de vue général, cet aperçu des mécanismes généraux de l'expression des gènes illustre l'importance des processus transcriptionnels et co-transcriptionnels dans la détermination du destin cytoplasmique des ARNm eucaryotes. Ainsi l'abondance d'un ARNm résulte de l'équilibre existant entre son taux de synthèse/maturation dans le noyau, et sa stabilité post-transcriptionnelle dans le cytoplasme. Depuis plusieurs années, un nombre croissant de travaux ont été publiés concernant l'existence de phénomènes de couplage entre la transcription et la dégradation cytoplasmique des ARNm. Dans le chapitre qui suit, les principales observations décrivant ce processus émergents sont abordées afin de déchiffrer les bases de ce nouveau modèle de régulation de l'expression des gènes eucaryotes.

A. Couplage à l'échelle globale

Le concept de couplage synthèse/dégradation des ARNm a été démontré à l'échelle globale du transcriptome. Généralement, la plupart des travaux portant sur la régulation des gènes ne distinguent pas la contribution de chaque processus et quantifient l'abondance des transcrits dans un état d'équilibre résultant de leurs taux de synthèse et de dégradation. Les études transcriptomiques décrivant ce phénomène ont donc en commun le fait de dissocier le taux de production des ARNm de leur taux de dégradation. Par exemple, des analyses en présence ou non d'actinomycine D, une molécule qui bloque la transcription, ont été réalisées chez *S. cerevisiae* pour mesurer les taux de synthèse et de dégradation des ARNm à l'échelle globale en réponse à différents stimuli. Les cinétiques d'induction génique et de dégradation post-transcriptionnelle ont ainsi été comparées lors de deux types de stress : l'un induisant une réponse adaptative rapide et transitoire (stress oxydatif), l'autre provoquant une réponse lente et durable (dommages à l'ADN). Dans la réponse rapide et transitoire au stress, les transcrits de gènes activés sont produits rapidement et fortement mais paradoxalement très vite dégradés. Inversement lors d'une réponse lente et durable au stress, les ARNm s'accumulent

lentement et s'avèrent très stables au niveau post-transcriptionnel. Ces résultats indiquent l'existence d'interactions entre les mécanismes de production et de dégradation des ARNm et que des modes différentiels de connexion permettent de moduler la cinétique d'induction des gènes (Shalem et al., 2011, 2008).

D'autres études ont rapporté ce phénomène de coordination globale chez les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe*, ainsi que chez les mammifères lors de l'induction des gènes immunitaires et pro-inflammatoires (Elkon et al., 2010; Molin et al., 2009; Rabani et al., 2011; Sun et al., 2012). Le fait que des réponses transcriptionnelles rapides s'accompagnent de forces opposées de dégradation des transcrits s'avèrent être un avantage pour la cellule eucaryote, particulièrement lors de la réponse à un stress. L'activité d'un large spectre de gènes doit en effet être coordonnée et optimisée tout au long des phases d'induction transcriptionnelle, d'adaptation et le retour à une situation normale (Shalem et al., 2008).

Par ailleurs, des phénomènes de co-régulation et de rétrocontrôle mutuel entre la transcription et la dégradation ont été rapportés chez la levure *S. cerevisiae* et la souris (Helenius et al., 2011; Sun et al., 2012). En effet, l'atténuation du taux de transcription *via* des mutations dans l'ARN polymérase II diminue en même temps le taux de dégradation des ARNm. A l'inverse, l'augmentation des taux de transcription augmente la vitesse de dégradation des ARNm. Ces observations suggèrent l'existence de mécanismes de coordination et de compensation permettant de réguler l'abondance globale des ARNm.

B. Coordination liée au promoteur

De manière intéressante, Enssle et ses collaborateurs ont décrit dans des cellules humaines pour la première fois en 1993 un phénomène de régulation de la dégradation d'un ARNm directement influencé par le promoteur. Les auteurs ont montré que le remplacement du promoteur du gène de la β -globine par le promoteur du gène codant la thymidine kinase d'un virus *Herpes simplex* modifie fortement le devenir post-transcriptionnel de l'ARNm synthétisé, indépendamment de la quantité absolue et de la cinétique d'accumulation de l'ARNm (Enssle et al., 1993). Bien que les bases mécanistiques de ce phénomène demeurent encore mal comprises, ces données suggèrent l'implication des promoteurs dans la régulation de la stabilité des ARNm chez l'humain.

Chez la levure, un promoteur conventionnel est composé d'un élément promoteur de base et d'une séquence activatrice en amont appelée UAS (Upstream Activating Sequence), contenant habituellement des éléments de fixation pour des facteurs de transcription (Guarente, 1988). En 2011, deux études ont été publiées conjointement dans la revue *Cell*

démontrant que les promoteurs et les éléments UAS contribuent à la régulation de la stabilité des ARNm (Bregman et al., 2011; Trcek et al., 2011). A. Bregman et ses collaborateurs ont ainsi démontré que l'UAS présent dans le promoteur du gène *RPL30* confère une demi-vie plus courte au transcrit *Rpl30*, altérant sa cinétique de dégradation. Cette séquence UAS s'avère être un élément de fixation pour le facteur de transcription Rap1p, que les auteurs décrivent comme nécessaire pour induire la dégradation de l'ARNm. Le facteur Rap1p via sa fixation sur le promoteur stimule donc à la fois la synthèse et la dégradation d'une population spécifique d'ARNm endogènes (Bregman et al., 2011). Indépendamment, T. Trcek et ses collaborateurs ont montré qu'un promoteur peut influencer la stabilité de ses transcrits de façon dépendante du cycle cellulaire. Les auteurs se sont focalisés sur les gènes *SWI5* et *CLB2*, régulateurs de la progression mitotique, et dont les ARNm présentent une forte stabilité dans les étapes précoces du cycle cellulaire, puis sont brutalement dégradés après le passage en mitose. Ces deux gènes sont co-régulés *via* un promoteur et des facteurs de transcription communs. Leur résultats montrent que le facteur Dbf2p est recruté sur les promoteurs *SWI5* et *CLB2*, chargé co-transcriptionnellement sur les ARN naissants, et exporté avec les ARNm vers le cytoplasme où il va réguler leur cinétique de dégradation en fonction du cycle cellulaire (figure 20). Ce contrôle de la dégradation par le promoteur permet ainsi à la cellule de coordonner l'expression d'un groupe de gènes présentant des promoteurs similaires. Par exemple, les gènes *SWI5* et *CLB2* partagent la séquence de leurs promoteurs avec 33 autres gènes, tous impliqués dans la transition G2/M (Trcek et al., 2011). Cette coordination entre synthèse et dégradation des ARNm au sein d'un groupe de gènes pourrait permettre l'oscillation de leur expression nécessaire à l'enchaînement des phases du cycle cellulaire. Les

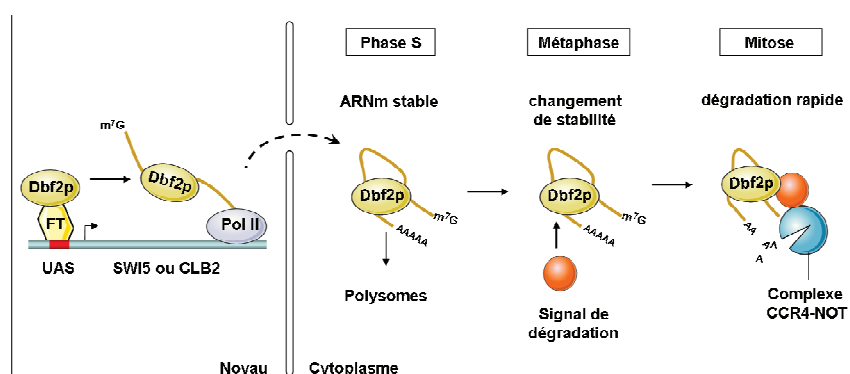


Figure 20 : Modèle de coordination entre la synthèse et la dégradation des ARNm *SWI5* et *CLB2* chez *S. cerevisiae*. Dbf2p est recruté par un facteur de transcription (FT) sur les promoteurs *SWI5* et *CLB2* au niveau de la séquence UAS et est transféré co-transcriptionnellement sur les ARNm *SWI5* et *CLB2*. Après export, ces ARNm sont stabilisés jusqu'en prométaphase où un signal de dégradation induit le recrutement par Dbf2p de la machinerie de déadénylation et de dégradation des ARNm *SWI5* et *CLB2* (complexe CCR4-NOT).

facteurs Dbf2p et Rap1p constituent le stéréotype d'une nouvelle classe de facteurs coordinateurs dont le recrutement au niveau d'un promoteur stimule à la fois la synthèse et la dégradation des ARNm. Par ailleurs, des données bioinformatiques publiées récemment montrent qu'à l'échelle globale chez la levure, les gènes partageant des promoteurs communs ou analogues présentent des profils de stabilité de leurs ARNm similaires. Cette corrélation est également retrouvée dans les cellules de mammifères (Dori-Bachash et al., 2012).

C. Le concept d'empreinte transcriptionnelle

L'existence de « coordinateurs ARN » capable de réguler l'ARNm de sa synthèse jusqu'à sa dégradation est au centre du concept d' « empreinte transcriptionnelle » déposée sur l'ARNm lors de la transcription (Choder, 2011). L'exemple le mieux caractérisé actuellement concerne le module Rpb4/7 de l'ARN polymérase II chez la levure. L'ARN polymérase II est composée de 12 sous-unités (Rbp1–Rbp12) (Young, 1991). L'étude de sa structure cristallographique a révélé l'existence de deux modules distincts pouvant se dissocier (Armache et al., 2005; Jasiak et al., 2008). Le premier, comprenant dix sous-unités, constitue la base de l'activité catalytique du complexe. Le deuxième est constitué par un hétérodimère Rpb4–Rpb7 qui s'avère indispensable au processus d'initiation de la transcription, mais également au recrutement des facteurs de maturation de l'extrémité 3' de l'ARN et au choix du site de polyadénylation (Edwards et al., 1991; Orlicky et al., 2001; Runner et al., 2008). Deux études ont montré que le module Rpb4/7 se dissocie de la polymérase II pendant la phase d'élongation pour s'associer avec le transcrit naissant et réguler les étapes ultérieures de du cycle de l'ARNm. Le module Rpb4/7 est en effet impliqué dans le contrôle des processus d'export, de dégradation dans les sens 3'→5' et 5'→3', et d'initiation de la traduction des ARNm *via* son interaction avec eIF3 (Harel-Sharvit et al., 2010; Lotan et al., 2007, 2005; Selitrennik et al., 2006).

Des mutants fonctionnels de l'ARN polymérase II présentant une faible affinité pour le module Rpb4/7 ont été isolés chez la levure. Leur analyse a mis en évidence une diminution de l'interaction de Rpb4/7 avec les ARNm, associée à d'importantes altérations des processus de déadénylation des ARNm et d'initiation de la traduction (Goler-Baron et al., 2008; Shalem et al., 2011). Des études transcriptomiques réalisés sur ces souches de levures mutantes démontrent la présence d'importants problèmes de dégradation des ARNm à l'échelle globale, particulièrement lors de la réponse au stress (Shalem et al., 2011). L'ensemble de ces travaux mettent en évidence le rôle essentiel de l'ARN polymérase II et de son module Rpb4/7,

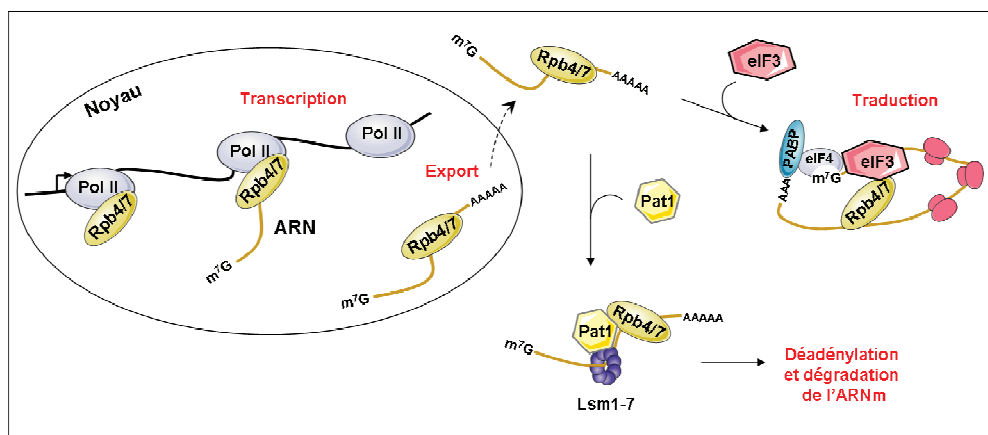


Figure 21 : Modèle de régulation du destin cytoplasmique de l'ARNm par l'ARN pol II. Le module Rpb4/7 de l'ARN pol II est nécessaire à la transcription, puis se dissocie pour s'associer avec le transcrit et réguler son export. Dans le cytoplasme, Rpb4/7 régule l'initiation de la traduction via son interaction avec eIF3, mais également la dégradation de l'ARNm en recrutant le facteur Pat1 qui s'associe au complexe Lsm1-7. Rpb4/7 régule également la déadénylation de l'ARNm et induit la dégradation de l'ARNm par les deux voies 5'-3' et 3'-5'.

véritable empreinte transcriptionnelle, dans la régulation du destin cytoplasmique des ARNm (figure 21).

Bien que le rôle coordinateur de la machinerie transcriptionnelle n'ait pas été formellement montré chez les métazoaires, des travaux ont décrit le recrutement de RBP sur les ARNm naissants de façon dépendante de la machinerie transcriptionnelle et régulant la dégradation dans le cytoplasme. Par exemple, le groupe de M. Gorospe a démontré dans des cellules de mammifères que les protéines FMRP et hnRNPC se lient co-transcriptionnellement à l'ARNm APP (alpha-amyloid protein) pour réguler de manière compétitive la dégradation ou la traduction de l'ARNm. Le facteur FMRP (Fragile X-mental retardation protein) est déposé sur l'ARNm pendant la transcription et inhibe sa traduction en l'orientant vers les P-bodies, alors que hnRNPC se lie de manière compétitive au même niveau que FMRP et permet la traduction du transcrit (Kim et al., 2009; Lee et al., 2010).

L'ensemble de ces résultats suggèrent que le mécanisme de couplage synthèse/dégradation des ARNm repose en grande partie sur l'ARN polymérase et son module Rpb4/7, ainsi que sur le recrutement de RBP sur le promoteur lors des phases d'initiation et d'élongation de la transcription. Bien que la machinerie de couplage ne soit pas totalement caractérisée, la liste des coordinateurs potentiels s'avère d'ores et déjà très importante (Haimovich et al., 2013). L'un des coordinateurs hypothétiques le plus suspecté d'être impliqué dans le couplage est le complexe CCR4-NOT. Sa caractérisation fonctionnelle chez l'humain a été au centre des

recherches menées pendant mon doctorat. La section suivante aborde le rôle central du complexe CCR4-NOT dans la régulation de l'expression des gènes eucaryotes.

III. Le complexe CCR4-NOT

A. Le cœur du complexe

De la levure jusqu'aux mammifères, la composition du complexe CCR4-NOT est très conservée (Collart and Panasenko, 2012). Chez la levure, la structure de base contient neuf sous-unités : Not1, Not2, Not3, Not4/Mot2, Not5, Caf130, Caf40, Pop2/Caf1 et CCR4 (tableau 2), qui s'assemblent pour former un complexe de 0,9-1,2 MDa. Ce complexe coexiste dans la cellule avec une version minoritaire de 1,9-2 MDa contenant les sous-unités Dhh1, Ddf2, Caf4 et Btt1 (Bai et al., 1999a; H. Y. Liu et al., 1998). Des complexes de poids moléculaires identiques ont été détectés dans des extraits cellulaires humains (Gavin et al., 2002; Morel et al., 2003). Le complexe CCR4-NOT de 0,9-1,2 MDa constitue probablement le cœur minimal, alors que celui de 1,9-2 MDa correspond à un ensemble de versions composées des sous-unités de base associées à différentes combinaisons de protéines partenaires.

Ces neuf sous-unités sont retrouvées chez tous les eucaryotes, avec toutefois quelques exceptions. Notamment, le génome de la drosophile ne semble pas posséder de gènes codant pour *CAF130*. Un autre exemple concerne les protéines Not3 et Not5 qui présentent un taux de similarité de 44% au niveau de leur domaine coiled-coil N-terminal chez la levure. Chez l'humain et la drosophile, il n'existe qu'un seul gène codant une protéine similaire aux domaines N-terminal de Not3 et Not5, et qui est appelée CNOT3 (Albert et al., 2000; Temme et al., 2004). Récemment, la protéine humaine C2ORF29/CNOT11 a été identifiée comme un nouveau membre du complexe après purification et analyse en spectrométrie de masse. Chez la drosophile et les mammifères, C2ORF29/CNOT11 s'associe à CNOT10 pour un former un module distinct non retrouvé chez la levure (Bawankar et al., 2013, p. 29; Mauxion et al., 2013, p. 29).

Les premières fonctions du complexe CCR4-NOT ont été élucidées *via* des analyses génétiques de souches de levures mutantes, lors de cribles ayant pour but de caractériser de nouveaux régulateurs de l'expression génique et de la croissance cellulaire. Ainsi Not1 et Not2 ont été identifiées lors de cribles génétiques sur des mutants présentant un arrêt du cycle cellulaire en G1 (Reed, 1980). D'autres analyses génétiques ont ensuite conduit à la

Tableau 2. Orthologues et homologues du complexe CCR4-NOT

<i>S. cerevisiae</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>H. sapiens</i>	Domaine/famille
Not1	Not1	CNOT1	
Not2	Not2	CNOT2	
Not3	Not3	CNOT3	
Not4	Not4	CNOT4	RING E3 Ligase
Not5			
Ccr4	twin/CCR4	CNOT6/CCR4a	EEP, LRR
		CNOT6L/CCR4b	EEP, LRR
Pop2/Caf1	POP2	CNOT7/CAF1a	DEDD
		CNOT8/POP2/CAF1b/CALIF	DEDD
Caf40	CAF40	CNOT9/hRcd1	
Caf130		CNOT10	
Dhh1	Me31B	Rck/p54/DDX6	DEAD-box
	C2ORF29/CNOT11	C2ORF29/CNOT11	

caractérisation de Not1, Not2 et Not4 en tant que régulateurs de la croissance des levures de manière dépendante du type sexuel *via* l'augmentation de l'expression des gènes de réponse aux phéromones (de Barros Lopes et al., 1990; Mösch and Fink, 1997). Le facteur Ccr4 (Catabolite Carbon Repressor 4) a initialement été découvert pour son rôle dans l'activation du gène *ADH2* en présence d'une source de carbone non-fermentative (Denis and Malvar, 1990; Denis, 1984). De même, la sous-unité Pop2 (*PGK* promoter directed over production), également appelée Caf1 (CCR4-associated factor 1) a été mise en évidence chez la levure lors de l'analyse de mutants ne réprimant plus l'expression de la phosphoglycérate kinase (PGK) dans un milieu dépourvu de glucose (Sakai et al., 1992). Les premières caractérisations d'un mécanisme moléculaire ont été révélées par Collart et Struhl en 1994 dans une étude de criblage de mutants présentant une augmentation de l'expression du gène *HIS3* dont le promoteur ne possède pas de boîte TATA. Ces travaux ont identifié les facteurs NOT (Negative On TATA-less) comme des répresseurs spécifiques de la transcription indépendante de la boîte TATA (Collart and Struhl, 1994). Ces cribles génétiques chez la levure ont ainsi ouvert la voie à plus d'une décennie d'études biochimiques et génétiques, identifiant le complexe CCR4-NOT comme un acteur majeur de la régulation de l'expression des gènes.

B. Structure du complexe

L'ensemble des connaissances concernant la structure globale et les interactions au sein du complexe CCR4-NOT proviennent d'expériences de double-hybride et de co-

immunoprécipitation chez la levure. De nombreux travaux ont ainsi montré que Not1 forme un véritable échafaudage structural autour duquel s'articulent les sous-unités du complexe associées en modules distincts (Collart and Panasenko, 2012) (figure 22A). Not1 est en effet la sous-unité la plus volumineuse (240 kDa) du complexe. Elle recrute la protéine Caf1/Pop2, qui est elle-même nécessaire au recrutement de Ccr4 pour former le « module déadénylase » du complexe (Tucker et al., 2002a). L'extrémité C-terminale de Not1 interagit avec Not2, Not3, Not4 et Not5 pour former le « module NOT » (Bai et al., 1999b; Deluen et al., 2002). Not2/CNOT2, la plus petite sous-unité, est indispensable au maintien de la stabilité du complexe CCR4-NOT (Ito et al., 2011; Russell et al., 2002). En double-hybride, la sous-unité Not3/CNOT3 interagit uniquement avec Not2/CNOT2, suggérant un rôle crucial de Not2/CNOT2 dans la structuration du module NOT (Ito et al., 2011). Concernant la sous-unité Not4/CNOT4, elle est stablement associée au complexe chez la levure, mais pas chez la drosophile et l'humain où cette association physique avec le complexe n'est pas formellement démontrée (Jeske et al., 2006; Lau et al., 2009; Panasenko and Collart, 2011). Caf130 est la sous-unité la plus large après Not1, son rôle est inconnu mais elle s'avère indispensable à l'intégrité du complexe (Azzouz et al., 2009b). En plus du module de déadénylation dans la partie centrale de Not1 et du module NOT en C-terminal, un troisième module a été identifié à l'extrémité N-terminale, constitué des protéines CNOT10 et C2ORF29/CNOT11 (Bawankar et al., 2013; Mauxion et al., 2013).

La forme globale du complexe a été révélée récemment par des analyses en microscopie électronique après purification chez la levure suite à une étape de « cross-linking » sur un gradient de glycérol (Nasertorabi et al., 2011). L'analyse a révélé un complexe globalement structuré en forme de « L » avec deux bras de longueur similaire (figure 22B). Ce type d'analyse microscopique ne permet toutefois pas de caractériser l'agencement des sous-unités au sein du complexe. Un degré de résolution supérieur a été obtenu très récemment avec la publication de deux études cristallographiques sur l'interaction entre Not1 et les déadénylases Caf1 et Ccr4 chez la levure et l'humain (Basquin et al., 2012; Petit et al., 2012). Les deux analyses montrent que la partie centrale de Not1 possède un domaine MIF4G reconnaissant Caf1, qui à son tour se lie au domaine LRR de Ccr4. Dans cette configuration, les sites catalytiques des déadénylases s'avèrent être complètement accessibles à leur substrat ARN. De nouvelles études cristallographiques devraient voir le jour prochainement afin de mettre en évidence la structuration des modules NOT et CNOT10-CNOT11.

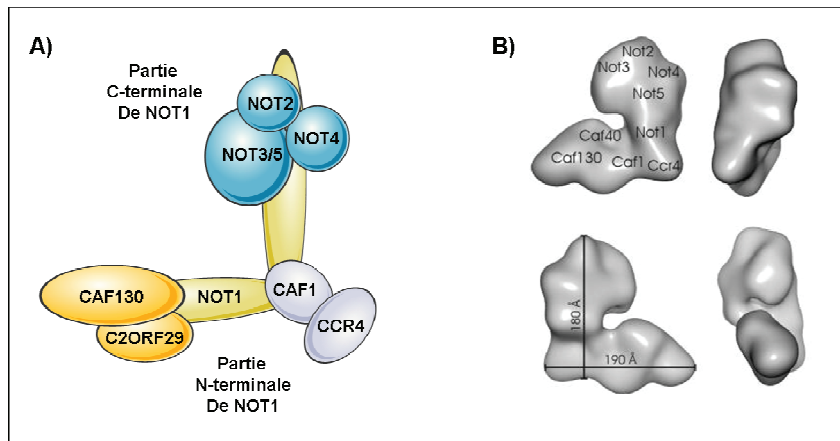


Figure 22 : Organisation structurale du complexe CCR4-NOT. A) Schéma récapitulatif des interactions au sein du complexe montrant l'organisation en modules des sous-unités autour de NOT1. B) Modélisation de la structure globale du complexe CCR4-NOT (extrait de Nasertorabi et al., 2011). L'analyse en microscopie électronique du complexe purifié révèle une forme globalement structurée en L. La position des sous-unités est arbitrairement basée sur des considérations bibliographiques et de taille, la résolution de la microscopie électronique ne permettant pas de les identifier précisément.

C. Fonctions du complexe

1) Modifications des histones

L'implication de CCR4-NOT dans la régulation des modifications post-traductionnelles des histones a particulièrement été décrite chez la levure. Plusieurs publications démontrent le rôle des protéines Not, et notamment Not4, dans l'activation de la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me3) (Laribee et al., 2007; Mulder et al., 2007a). La délétion de Not4, mais pas de Caf1 et Ccr4, induit une diminution globale de H3K4me3. Cet effet s'avère reposer sur l'activité ubiquitine ligase E3 de Not4 qui catalyse la polyubiquitylation et la dégradation de Jhd2, principale déméthylase de H3K4me3 chez la levure. Ce mécanisme semble être conservé chez les mammifères puisque CNOT4 régule également la polyubiquitylation de JARID1C, principale homologue de Jhd2 chez l'humain (Albert et al., 2002a; Laribee et al., 2007; Mersman et al., 2009). Une autre sous-unité du complexe a été impliquée dans la régulation de la méthylation des histones. En effet la protéine humaine CAF1/CNOT7 régule négativement la méthylation de l'arginine 3 de l'histone H4 (H4R3me) *via* son interaction avec l'arginine méthyltransférase PRMT1 (Robin-Lespinasse et al., 2007). L'homologue de PRMT1 chez la levure, Hmt1, est également détecté dans le complexe, mais aucune donnée concernant la régulation d'H4R3 n'a été publiée (Kerr et al., 2011).

En plus de la méthylation, plusieurs études démontrent l'implication de CCR4-NOT dans la modulation de l'acétylation des histones H3 et H4. Un crible effectué à partir de 4848 souches

de levures mutantes a été réalisé pour identifier des nouveaux régulateurs de l'acétylation des histones. Une diminution du niveau global de l'acétylation de l'histone H3 a ainsi été observée dans les souches *ΔCcr4*, *ΔNot4* et *ΔNot5* (Peng et al., 2008). Ce phénotype peut s'expliquer par le fait que des interactions génétiques et physiques ont été décrites entre CCR4-NOT, particulièrement Not2, et le complexe histone acetyl-transférase SAGA (Benson et al., 1998; Biswas et al., 2006; Collart, 1996). Bien que la plupart de ces observations proviennent de la levure, l'ensemble des acteurs épigénétiques sur lesquels agit le complexe CCR4-NOT présentent des homologues chez les métazoaires, suggérant la conservation de ce phénomène au niveau évolutif.

2) Initiation de la transcription

En parallèle de son implication dans les processus épigénétiques, de nombreux travaux décrivent un rôle de CCR4-NOT dans l'initiation de la transcription. Cette étape chez la levure est dépendante soit du facteur TFIID, soit du complexe SAGA, les deux permettant de recruter la protéine TBP sur le promoteur (Huisinga and Pugh, 2004). Plusieurs sous-unités présentent des interactions physiques et génétiques avec cette machinerie d'initiation. Chez la levure, il a été décrit que le complexe CCR4-NOT s'associe à TFIID et SAGA sur les promoteurs afin de contrôler le recrutement de TBP (Biswas et al., 2006; Deluen et al., 2002; Lemaire and Collart, 2000; Lenssen et al., 2005). Cette association dépend de la présence ou non de la boîte TATA sur le promoteur et permet de réguler positivement et négativement la transcription, en particulier celle des gènes de réponse au stress. Ainsi CCR4-NOT, *via* Not2 et Not5, est nécessaire à l'expression dépendante de TFIID du gène *RNR3*, et est recruté sur le promoteur et les séquences codantes lors de l'activation génique (Kruk et al., 2011; Mulder et al., 2005). En parallèle, les analyses transcriptomiques utilisant des mutants de CCR4-NOT suggèrent que son activité est prédominante au niveau des gènes dont l'expression est dépendante de SAGA (Azzouz et al., 2009b; Cui et al., 2008). Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine suivie de séquençage (ChIP-seq) ont permis de mettre en évidence la présence de la sous-unité Pop2/Caf1 de CCR4-NOT au niveau des promoteurs et des séquences transcrites des gènes spécifiquement régulés par SAGA (Venters et al., 2011).

Le rôle de CCR4-NOT dans la transcription a également été montré chez les métazoaires, particulièrement lors de l'activation transcriptionnelle associée aux récepteurs nucléaires et à la signalisation hormonale. Les premières observations de ce phénomène proviennent du fait

que la surexpression de CCR4 et CAF1 dans des cellules humaines augmente la transactivation du récepteur aux oestrogènes ER α (Morel et al., 2003). Une autre étude a ensuite démontré le rôle des sous-unités CCR4 et RCD1 (yCaf40) dans l'activation transcriptionnelle associée aux récepteurs à l'acide rétinoïque (RAR), aux hormones thyroïdiennes (TR), aux glucocorticoïdes (GR) et aux oestrogènes (ER α), de manière dépendante du ligand (Garapaty et al., 2008). De la même façon, les cellules murines invalidées pour l'expression de CAF1/CNOT7 présentent une inhibition de l'activation transcriptionnelle dépendante du récepteur aux rétinoïdes (RXR). La base de ce phénomène semble reposer sur l'interaction de CAF1/CNOT7 avec RXR β , régulant la fixation du récepteur sur ses séquences cibles (Nakamura et al., 2004). De manière intéressante, les souris *Cnot7* $-/-$ présentent des troubles de la fertilité chez le mâle, caractérisés par une oligo-asthénéo-tératozoospermie (Berthet et al., 2004; Nakamura et al., 2004). Les auteurs de l'étude ont proposé que ce phénotype pouvait potentiellement s'expliquer par une perturbation de l'activation transcriptionnelle associée à la signalisation des récepteurs hormonaux (Nakamura et al., 2004). En plus de ce rôle de co-activateurs de CCR4-NOT, plusieurs études du groupe de M. Timmers décrivent également qu'une fonction de répresseur transcriptionnel est associée à CCR4-NOT. Ainsi l'activation génique dépendante du récepteur ER α est réprimée par la surexpression de CNOT1 ou CNOT2, et peut être restaurée par l'ajout de molécules inhibant les histones déacétylases (HDAC) ou par l'invalidation du complexe co-répresseur SMRT/NCoR. De la même façon, l'invalidation des protéines humaines CNOT1 ou CNOT3 augmentent l'expression des gènes de réponse aux oestrogènes. (Jayne et al., 2006; Winkler et al., 2006; Zwartjes et al., 2004). Dans ce sens, CCR4-NOT semble réprimer l'activation transcriptionnelle en agissant directement au niveau des promoteurs puisque les sous-unités CNOT1, CNOT3 et POP2 sont détectées en ChIP au niveau des sites de fixation de l'ARN pol II (Winkler et al., 2006). De nombreuses données se sont ainsi accumulées quant au rôle du complexe CCR4-NOT dans l'activation ou la répression transcriptionnelle liée à la signalisation hormonale. Bien que le mécanisme d'action demeure mal compris, le lien entre CCR4-NOT et l'orchestration des modifications post-traductionnelles des histones pourraient être à la base de ce phénomène.

3) Elongation de la transcription

L'implication de CCR4-NOT dans le contrôle de l'élongation de l'ARN pol II a fait l'objet d'un intérêt relativement tardif. Les données initiales proviennent d'analyses génétiques et

phénotypiques des mutants du complexe CCR4-NOT chez la levure. Plusieurs travaux ont montré la présence d'interactions létales entre les mutations de CCR4-NOT et les mutations affectant les facteurs d'élongation TFIIS, FACT, DSIF et Paf1c (Biswas et al., 2006; Denis et al., 2001). Paf1c est un complexe très conservé qui s'associe à l'ARN pol II du promoteur jusqu'à la formation de l'extrémité 3' de l'ARN pour réguler son élongation (Jaehning, 2010). Plusieurs sous-unités de Paf1c ont été détectées au sein d'un complexe contenant l'ARN pol II et des membres du complexe CCR4-NOT (Chang et al., 1999). Le développement de techniques d'analyse du processus d'élongation telles que le GLAM (gene length-dependent accumulation of mRNA) utilisant le gène rapporteur LacZ ont permis de mieux comprendre l'implication de CCR4-NOT dans l'élongation (Morillo-Huesca et al., 2006). Ainsi les extraits préparés à partir de mutants *Not5Δ* s'avèrent incapables d'assurer la transcription d'un long gène LacZ *in vitro* (Gaillard et al., 2009). Une étude approfondie menée par le groupe de J. Reese a permis de mettre en évidence que la délétion des sous-unités Ccr4, Not4 ou Dhl1 perturbe la processivité de l'ARN pol II (Kruk et al., 2011). Cette même étude a également démontré l'association de CCR4-NOT avec les régions codantes de plusieurs gènes de levure mais pas avec les régions régulatrices en amont, suggérant un recrutement dépendant de la transcription et l'ARN pol II. Des expériences de reconstruction *in vitro* de l'élongation utilisant des complexes CCR4-NOT et ARN pol II purifiés ont montré que CCR4-NOT

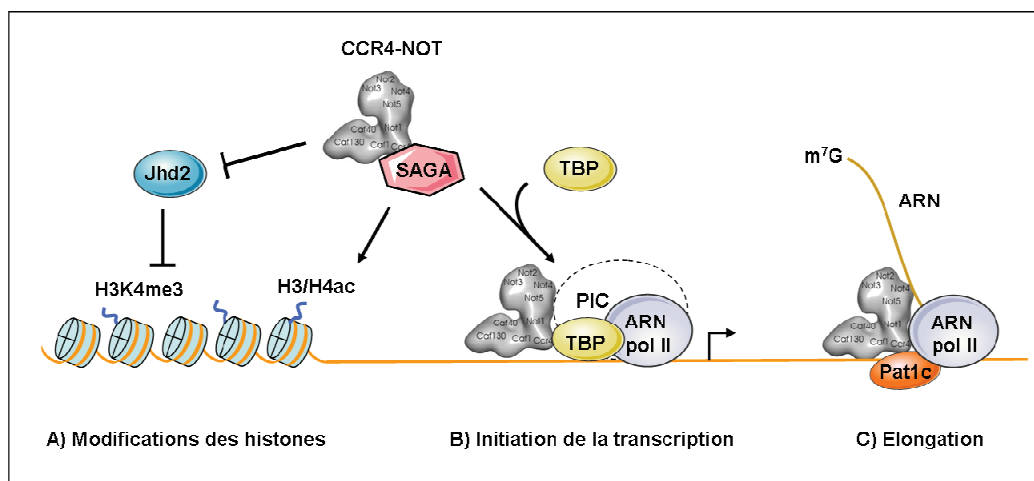


Figure 23 : Implications du complexe CCR4-NOT dans le contrôle de la transcription chez la levure. A) Modifications post-traductionnelles des histones. CCR4-NOT régule H3K4me3 *via* la sous-unité NOT4 qui ubiquitinylye l'histone déméthylase Jhd2 et induit sa dégradation. CCR4-NOT régule aussi l'acétylation de H3 et H4 *via* son interaction avec le complexe SAGA. B) L'initiation de la transcription. CCR4-NOT régule le recrutement de TBP au niveau du promoteur pour former le PIC, principalement en s'associant au complexe SAGA et possiblement avec TFIID en fonction des promoteurs. C) Contrôle de l'élongation. CCR4-NOT s'associe au complexe d'élongation, et notamment Pat1c, pour réguler la processivité de l'ARN pol II.

interagit avec le complexe d'élongation formé sur la matrice ADN à transcrire et est capable de débloquent l'ARN pol II lors d'un arrêt anormal de la transcription (Kruk et al., 2011). Bien qu'un nombre croissant d'études s'intéressent au lien entre CCR4-NOT et l'élongation, le mécanisme d'action au sein de ce processus demeure mal compris, et notamment la connexion avec son rôle dans l'initiation de la transcription et la régulation épigénétique.

4) Contrôle qualité des ARN nucléaire et export

En aval de l'implication du complexe CCR4-NOT dans la synthèse des ARNm, des travaux font état d'un rôle potentiel dans le contrôle qualité et la surveillance nucléaire des ARNm. Comme évoqué dans le paragraphe I. C. 3, le complexe CCR4-NOT est associé dans le noyau à des sous-unités de l'exosome nucléaire et du complexe de polyadénylation TRAMP (Trf4/Air/Mtr4p) chez la levure (Azzouz et al., 2009a). Les mutants CCR4-NOT présentent également une interaction létale avec les mutants de l'exosome, et ces deux types de déficiences conduisent à des accumulations nucléaires d'ARN non codants (ARNt, ARNr, snARN et snoARN) polyadénylés disposant d'anomalies de maturation (Assenholt et al., 2011b; Azzouz et al., 2009a; LaCava et al., 2005; Petfalski et al., 1998). Une étude récente a montré que le complexe CCR4-NOT est nécessaire à la localisation des ARN anormalement maturés au niveau de leur site de transcription, suggérant une fonction de rétention des ARNm aberrants par CCR4-NOT pour éviter leur export et recruter l'exosome (Assenholt et al., 2011b).

En parallèle, plusieurs données suggèrent un rôle du complexe dans l'export de l'ARNm vers le cytoplasme. Les sous-unités Not5, Ccr4 et Caf1/Pop2 sont retrouvées associées aux facteurs d'export Nab2 et Hrp1, ainsi qu'à des composants de la face nucléaire du pore NPC chez la levure (Kerr et al., 2011). Cette association avec la machinerie d'export est régulée par l'activité arginine méthyl-transférase de Hmt1, homologue de levure de la protéine PRMT1 décrite comme un partenaire de CAF1/CNOT7 dans les cellules humaines (Robin-Lespinnasse et al., 2007). Par ailleurs, cette association dans les cellules humaines a pour conséquence de réguler positivement la méthylation de Sam68, une RBP nécessaire à la maturation et à l'export des ARN. Dans la mesure où la méthylation de Sam68 régule directement sa fixation au transcrit et sa localisation vers le cytoplasme, l'association CAF1-PRMT1 apparaît potentiellement comme un événement central du processus d'export (Côté et al., 2003). Des études de purification du complexe humain CCR4-NOT suivies d'analyses protéomiques en

spectrométrie de masse ont également mis en évidence que la plupart des sous-unités de CCR4-NOT sont associées aux facteurs NUP (nuclear pore complex protein), constituants majeurs du NPC humain exposés sur la face nucléaire du pore (Lau et al., 2009). Bien qu'il n'existe pas d'analyses fonctionnelles du rôle de CCR4-NOT dans le processus d'export, l'ensemble de ces données fait émerger un modèle dans lequel le complexe CCR4-NOT pourrait jouer un rôle coordinateur dans le contrôle qualité et la prise en charge des ARNm par la machinerie d'export.

5) Contrôle qualité et dégradation des protéines

Le complexe CCR4-NOT a été décrit dans les processus d'ubiquitylation des protéines et de dégradation protéasomale. La conjugaison d'un groupement ubiquitine sur une protéine cible régule notamment sa dégradation ou son activité et requiert l'activité consécutive de trois enzymes. L'ubiquitine est d'abord chargée sur une enzyme activatrice E1 dépendante de l'ATP, puis est activée par une enzyme de conjugaison E2, et est enfin attachée à son substrat protéique par une E3 ubiquitine ligase (Hochstrasser, 1996). La sous-unité Not4/CNOT4 du complexe CCR4-NOT a été caractérisée comme possédant une activité E3 ubiquitine ligase à domaine RING conservée de la levure jusqu'aux métazoaires (Albert et al., 2002b; Mersman et al., 2009; Mulder et al., 2007b). UbcH5B a été identifiée comme l'enzyme E2 fonctionnant avec CNOT4 chez les mammifères, et Ubc4/Ubc5 avec Not4 chez la levure (Mulder et al., 2007b; Winkler et al., 2004). Le premier substrat de Not4 a été décrit chez la levure et concerne le complexe associé au peptide naissant NAC (nascent associated polypeptide complex) composé d'un hétérodimère Egd1-Egd2. Il s'agit d'un complexe chaperon qui compose le tunnel de sortie du ribosome et se lie au peptide naissant pour le protéger (Rospert et al., 2002). Des travaux ont montré que plusieurs sous-unités de CCR4-NOT s'associent au NAC, dont Not4 qui catalyse l'ubiquitylation d'Egd1 et Egd2 lors d'un stress lié à une privation en glucose (Panasenکو et al., 2006). L'ubiquitylation du NAC s'avère être un événement important pour réguler sa stabilité, son association à la fois au ribosome et au protéasome, principale machinerie de dégradation des protéines polyubiquitylées (Panasenکو et al., 2009). Cette double association du NAC avec le ribosome et le protéasome suggère un rôle dans le contrôle de la qualité des protéines nouvellement synthétisées. Par extension, Not4 *via* son activité enzymatique apparaît comme un acteur important de ce mécanisme de surveillance lors d'un stress. Dans ce sens, une étude a montré que la délétion de Not4 ou la mutation de son domaine RING stabilise les produits peptidiques habituellement dégradés par

le protéasome et issus d'une traduction aberrante, notamment lors de l'activation de la voie de surveillance Non-Stop (Dimitrova et al., 2009). En parallèle de ces données, plusieurs travaux décrivent l'existence de connexions physiques et fonctionnelles entre CCR4-NOT et le protéasome. La délétion de Not4 chez la levure a pour conséquences de perturber la structure protéosomale et de conduire à l'accumulation de protéines polyubiquitylées (Panasenko and Collart, 2011). Ce phénotype peut s'expliquer par le fait que Not4 interagit *via* son domaine RING avec la sous-unité protéosomale Rpt6, mais également du fait que l'intégrité du protéasome est dépendante de Not4 et d'autres sous-unités de CCR4-NOT (Laribee et al., 2007; Panasenko and Collart, 2011). Bien que l'activité E3 ubiquitine ligase de Not4 soit conservée chez les métazoaires, l'implication du complexe CCR4-NOT dans le contrôle de la qualité traductionnelle et l'intégrité du protéasome n'a pas été montrée chez les métazoaires.

6) Dégradation des ARNm

(a) *Le module « déadénylase »*

L'aspect le plus étudié et le mieux caractérisé du complexe CCR4-NOT concerne son implication dans la déadénylation des ARNm et leur dégradation. Comme évoqué dans le paragraphe I.C.a, la dégradation d'un transcrit commence avec la suppression de la queue poly(A) qui perturbe la circularisation de l'ARN et induit son decapping et sa dégradation par des exoribonucléases. De manière générale, CCR4-NOT contient deux déadénylases requises pour la dégradation des ARNm *in vivo* : Ccr4 et Caf1 (Benoit et al., 2005; Tucker et al., 2002b, 2001). Sur la base d'homologies de séquences et d'activité enzymatique, Ccr4 a été répertorié dans la famille des déadénylases de type Exonucléase-Endonucléase-Phosphatase (EEP), alors que Caf1 appartient à la famille des nucléases de type DEDD, du nom des résidus aminoacides impliqués dans l'activité enzymatique (Bianchin et al., 2005; Daugeron et al., 2001; Draper et al., 1994; Thore et al., 2003; Wang et al., 2010). Chez la levure, Ccr4 est décrite comme la principale déadénylase, Caf1 ne possédant qu'une très faible activité intrinsèque *in vitro* et *in vivo* (J. Chen et al., 2002b; Thore et al., 2003; Tucker et al., 2002b). Bien qu'essentielle à la dégradation des ARNm et à la croissance de la levure, Caf1 apparaît davantage requise dans le maintien de l'intégrité du complexe CCR4-NOT en connectant Ccr4 au reste des protéines Not, ainsi que dans le recrutement de CCR4-NOT sur les ARNm à dégrader (Basquin et al., 2012; Goldstrohm et al., 2007, 2006). Par contraste, chez les métazoaires, CAF1 contribue significativement, voire de manière prédominante, à la

dégradation de la queue poly(A). Son activité déadénylase a été démontrée chez la drosophile, le xénope, la souris et l'homme (Bianchin et al., 2005; Cooke et al., 2010; Temme et al., 2004; Viswanathan et al., 2004).

Dans les cellules humaines, la protéine Ccr4 présente deux orthologues CCR4a/CNOT6 et CCR4b/CNOT6L. Plusieurs études ont montré le rôle redondant de ces deux facteurs vis-à-vis de la déadénylation et de leur présence dans le complexe CCR4-NOT, ainsi que leur capacité à réguler positivement la prolifération et la croissance cellulaire (Mittal et al., 2011b; Morita et al., 2007; Wang et al., 2010). De la même façon, Caf1 possède deux orthologues humains : CAF1/CNOT7 et POP2/CNOT8, dont les fonctions semblent également redondantes vis-à-vis de la déadénylation (Aslam et al., 2009). Afin d'analyser la composition et la diversité des déadénylases présentes au sein du complexe CCR4-NOT humain, le groupe de M. Timmers a réalisé la purification de chaque déadénylase de manière indépendante et analysé ses partenaires en spectrométrie de masse (Lau et al., 2009). Leur travaux montrent que CAF1/CNOT7 et POP2/CNOT8 sont présents dans des complexes CCR4-NOT distincts, et que seule une fraction minoritaire des complexes contenant POP2/CNOT8 est associée à CCR4, suggérant que le dimère POP2-CCR4 est moins stable que CAF1-CCR4. De même CCR4/CNOT6 et CCR4b/CNOT6L sont retrouvés associés à CAF1 dans CCR4-NOT de manière exclusive (Lau et al., 2009). L'existence de ces différentes déadénylases suppose la présence de nombreuses combinaisons de CCR4-NOT dans la cellule mammifère.

(b) Recrutement de CCR4-NOT sur les ARNm

L'activité déadénylase du complexe CCR4-NOT s'avère dégrader les queues poly(A) de manière sélective. Cette discrimination des ARNm repose sur l'action de protéines adaptatrices interagissant avec CCR4-NOT afin de recruter spécifiquement son activité sur les ARNm à dégrader. De nombreuses RBP reconnaissant généralement la région 3'UTR des ARNm ont été impliquées dans le contrôle de la déadénylation dépendante de CCR4-NOT. Chez la levure, Goldstrohm et Wickens ont fournis les premières évidences indiquant que les membres de la famille PUF (Pumilio fem binding factor), et notamment Puf5, recrute CCR4-NOT sur l'ARN pour induire sa dégradation. Les auteurs ont ainsi décrit que l'interaction physique entre Puf5 et Caf1 est nécessaire au recrutement de Ccr4 sur l'ARNm *HO*, particulièrement lors de la réponse au stress (Goldstrohm et al., 2007, 2006; Hook et al., 2007). Les RBP modulant l'adressage de CCR4-NOT sont cruciales lors du développement embryonnaire chez la drosophile. L'homologue de CCR4 joue en effet un rôle vital dans la

dégradation des queues poly(A) d'ARNm régulés au niveau développemental tels qu'*Oskar*, *Smg*, *cyc-B* et *nanos*. CCR4-NOT est ainsi spécifiquement recruté lors du développement précoce par les RBP Smaug et Bic-C (Chicoine et al., 2007; Zaessinger et al., 2006).

Chez les mammifères, l'un des exemples les mieux étudiés concerne le rôle des membres de la famille BTG/TOB. Les six membres de cette famille (BTG1, BTG2/Tis21/PC3, BTG3/ANA, BTG4/PC3B, Tob1 et Tob2) sont caractérisés par leur activité anti-prolifératrice et la présence d'un domaine BTG N-terminal qui s'associe aux déadénylases CAF1 et POP2 (Mauxion et al., 2009; Morel et al., 2003; Prévôt et al., 2001; Rouault et al., 1998). Ces facteurs activent la déadénylation d'une part en stimulant directement l'activité intrinsèque des déadénylases CAF1/POP2, comme le suggèrent des expériences de déadénylation *in vitro* (Mauxion et al., 2008). D'autres parts, les BTG/Tob présentent des domaines C-terminaux très variables impliqués dans diverses interactions protéines-protéines. Ainsi le facteur Tob1 interagit avec le domaine PAM2 de PABP afin de recruter le complexe CCR4-NOT sur les ARNm (Ezzeddine et al., 2007; Funakoshi et al., 2007) (figure 24A). Cette notion d'adaptateur a également été rapportée par des travaux montrant le rôle de Tob1 dans la connexion de CAF1 et CCR4-NOT à CPEB3 (cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 3). CPEB3 est une RBP reconnaissant spécifiquement les séquences riches en U dans

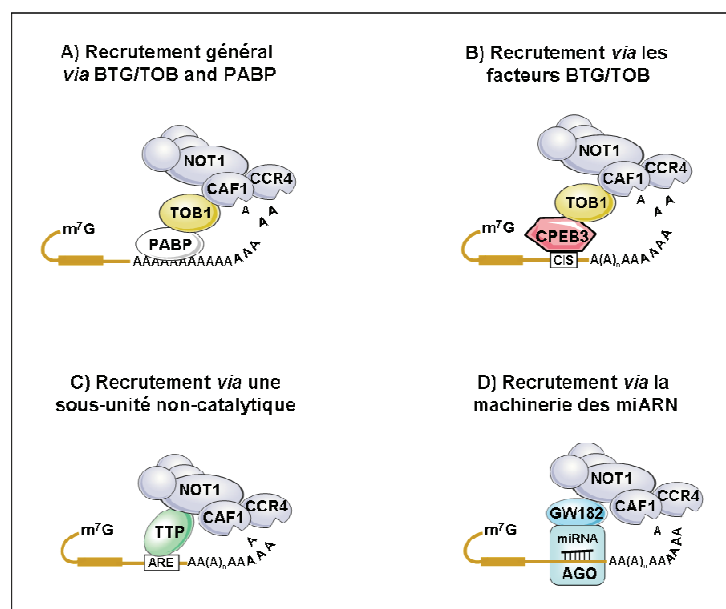


Figure 24 : Modèles schématiques du recrutement du complexe CCR4-NOT sur les ARNm. Les déadénylases peuvent être recrutées par les facteurs adaptateurs BTG/TOB, partenaire de CAF1, (A) *via* leur interaction avec le domaine C-terminal de PABP, ou (B) *via* des RBP spécifiques telles que CPEB3 qui se lie sur des séquences CIS. CCR4-NOT peut également être recruté (C) *via* ses sous-unités non catalytiques comme NOT1 qui se lie à TTP et permet de dégrader les ARN contenant les ARE, ou encore (D) *via* la machinerie des microARN par l'interaction de GW182 avec NOT1.

la région 3'UTR des ARNm pour induire leur déadénylation et dégradation *via* le recrutement de CCR4-NOT (figure 24B). Tob1 est également impliqué dans l'activation de la déadénylation de manière couplée à la terminaison de la traduction *via* son interaction avec le dimère eRF1-eRF3 (Funakoshi et al., 2007).

Les sous-unités non catalytiques du complexe CCR4-NOT sont également essentielles pour moduler le recrutement des déadénylases sur les ARNm (figure 24C et D). Comme évoqué dans les paragraphes I. C. 5 et I. D. 1. b, la sous-unité CNOT1 interagit avec TTP pour induire la déadénylation des ARNm contenant des éléments ARE lors d'un stress, et avec la sous-unité GW182 de la machinerie miRISC afin d'induire la dégradation des ARNm ciblés par des microARN (Brooks and Blackshear, 2013; Fabian and Sonenberg, 2012). De même chez la souris, la sous-unité CNOT3 est nécessaire à l'adressage du complexe CCR4-NOT sur une classe d'ARNm impliqués dans le catabolisme énergétique des cellules hépatiques (Morita et al., 2011).

7) Coordination de la synthèse et la dégradation des ARN

De la levure aux métazoaires, les fonctions du complexe CCR4-NOT se répartissent tout au long du processus de synthèse des ARNm, de l'initiation de la transcription dans le noyau jusqu'à la dégradation des transcrits dans le cytoplasme. Dans ce sens, CCR4-NOT présente une très forte similarité fonctionnelle avec le module Rpb4/7 décrit dans le paragraphe II. C. Chez la levure, des similarités phénotypiques ont été décrites puisque les mutants *Ccr4-Not* et *Rpb4* sont tous deux sensibles au stress, présentent des défauts d'élongation par l'ARN pol II et de déadénylation/dégradation des ARNm (Choder, 2004; Verma-Gaur et al., 2008). Bien que l'association fonctionnelle entre les deux complexes n'ait pas été formellement établie, CCR4-NOT est un partenaire du complexe d'élongation et de l'ARN pol II chez la levure (Kruk et al., 2011). Des données non publiées issues du groupe de J. Reese indiquent que cette interaction disparaît chez les souches de levures présentant une forme mutante de l'ARN pol II n'interagissant plus avec le module Rpb4/7 (Miller and Reese, 2012). Ce même groupe avait déjà caractérisé l'interaction de certaines sous-unités de CCR4-NOT avec les premières bases du transcrit naissant lors de l'élongation, suggérant une association du complexe sur l'ARN pol II à proximité du canal de sortie des ARN (Kruk et al., 2011). D'un point de vue structural, plusieurs études ont caractérisé l'emplacement du module Rpb4/7 à la sortie de ce même canal afin de prendre en charge le transcrit émergent, suggérant une forte proximité avec le complexe CCR4-NOT (Cramer et al., 2008; Ujvári and Luse, 2006). L'implication omniprésente du complexe CCR4-NOT dans l'expression génique semble être retrouvée dans

les cellules humaines, comme le suggère l'étude en spectrométrie de masse des partenaires des sous-unités du complexe menée par Lau et Timmers. Les auteurs ont identifié des centaines de partenaires du complexe dont la plupart fait partie de la machinerie de transcription, d'épissage, d'export et de transport des ARNm, avec des combinaisons différentes en fonction de la composition du complexe (Lau et al., 2009). Dans ce sens, un nouveau modèle est en train d'émerger dans lequel le complexe CCR4-NOT est associé à la particule mRNP de sa naissance jusqu'à sa dégradation, régulant toutes les étapes de l'expression d'un gène (Collart et al., 2013; Haimovich et al., 2013; Miller and Reese, 2012).

. Chapitre 2 : Résultats

I. Article 1 : hCAF1/CNOT7 régule la signalisation des Interférons en contrôlant le facteur STAT1

hCAF1/CNOT7 regulates interferon signaling by targeting STAT1

Chapat C, Kolytcheff C, Le Romancer M, Auboeuf D, De La Grange P, Chettab K, Sentis S and Corbo L.

The EMBO Journal. 2013 Feb 5. doi: 10.1038

A. Introduction à l'article 1

Le complexe CCR4-NOT est un régulateur essentiel de l'expression des gènes eucaryotes. La sous-unité CAF1/CNOT7 joue un rôle central dans la régulation de la fonction de CCR4-NOT. Elle est en effet nécessaire au maintien de l'intégrité du complexe et de son rôle dans la dégradation des ARNm, et au recrutement des facteurs essentiels à sa fonction. Dans ce sens, la protéine humaine hCAF1 possède une activité déadénylase, régule la méthylation des arginines *via* la modulation de PRMT1 et a été identifiée comme un régulateur transcriptionnel des récepteurs nucléaires et notamment le récepteur aux œstrogènes ER α . Bien que l'ensemble des travaux publiés sur hCAF1 lui confère une place importante dans la régulation de l'expression des gènes *via* son intégration dans différentes voies allant de la synthèse des ARNm jusqu'à leur dégradation, le mécanisme d'action de hCAF1 et surtout les voies de signalisation qu'elle régule restent encore mal compris dans les cellules humaines.

Afin de mieux comprendre la fonction de hCAF1, des populations cellulaires présentant une inactivation stable de l'expression de hCAF1 par interférence ARN ont été générées. La lignée MCF7, issue d'un carcinome mammaire dont la prolifération est dépendante d'ER α , a été retenue comme modèle cellulaire de base. Nous avons entrepris une étude transcriptomique de type *Exon Chip Array* nous permettant d'identifier les gènes régulés par hCAF1. Cette partie du projet a été réalisée en collaboration avec le Dr. Didier Auboeuf (CRCL, Lyon) et le Dr. Pierre de la Grange (Genosplice, Paris) qui possèdent une grande expertise concernant cette technologie. Notre étude a permis de mettre en évidence qu'il existait une étroite relation fonctionnelle entre la protéine hCAF1 et la voie de signalisation des interférons. Mon travail a donc consisté à mieux comprendre le rôle biologique de hCAF1 dans la cellule, d'une part en étudiant les caractéristiques de croissance des populations cellulaires dans lesquelles la protéine hCAF1 est inactivée, et d'autre part en étudiant les mécanismes d'action de la protéine hCAF1 dans la régulation de la voie des interférons.

Afin de permettre une meilleure compréhension de l'étude présentée, le paragraphe suivant se focalise sur la voie des interférons et son principal effecteur : le facteur de transcription STAT1. Les principaux résultats de l'article seront ensuite exposés.

B. La voie de signalisation des interférons

1) La voie canonique IFN/JAK/STAT1

Les interférons (IFN) sont des médiateurs protéiques sécrétés de la famille des cytokines jouant un rôle fondamental dans la défense immunitaire conférant une résistance aux infections virales et microbiennes en activant de nombreuses cellules du système immunitaire. Leurs activités entraînent des modifications de la prolifération cellulaire, la survie et l'apoptose aussi bien des cellules normales que tumorales (Borden et al., 2007). Il existe trois types d'interférons qui exercent leurs activités en se liant à différents récepteurs membranaires (Platanias, 2005). Les interférons de type I, incluant l'IFN α , IFN β , IFN ω , IFN τ , IFN κ et IFN ϵ , se fixent à un récepteur hétéromérique constitué des chaînes IFNAR1 et IFNAR2, dont la partie cytoplasmique du récepteur est liée aux tyrosines kinases TYK2 et JAK1 (Stark, 2007). La liaison des IFN à leur récepteur entraîne un changement conformationnel de ce complexe membranaire conduisant à l'activation des kinases qui vont phosphoryler les facteurs de transcription STAT1 et STAT2 (signal transducer and activator of transcription). Cette phosphorylation favorise l'interaction réciproque de leurs domaines SH2 (src homology 2) formant un hétérodimère STAT1-STAT2 qui s'associe au facteur IRF9 (IFN-regulated factor 9) pour constituer le complexe ISG3 (IFN stimulated gene factor 3). ISG3 est alors transporté dans le noyau pour activer l'expression de gènes de réponses à l'IFN *via* sa fixation sur des éléments du promoteur appelé ISRE (IFN-stimulated response element) (figure 25). L'IFN γ de type II se fixe sur un récepteur différent constitué d'un homodimère transmembranaire IFNGR1 et de deux chaînes cytoplasmiques IFNGR2 constitutivement associées aux kinases JAK1 et JAK2 (Boehm et al., 1997). Les kinases activées par la fixation de l'IFN γ sur ces récepteurs phosphorylent le facteur latent STAT1 qui s'homodimérise pour migrer dans le noyau et se fixer au niveau des éléments GAS (IFN γ -activated sequence) des promoteurs afin d'activer la transcription des gènes de réponse à l'IFN (Stark, 2007) (figure 25). Les IFN λ 1/ λ 2/ λ 3 de type III, découverts plus récemment, se fixent sur un récepteur complexe composé des chaînes IL10R2 et IFN λ R1, respectivement associées aux kinases TYK2 et JAK1 (Ank et al., 2006). Comme pour l'IFN de type I, l'IFN de type III permettent l'activation du complexe ISG3 qui se fixe sur des séquences ISRE.

Ces divers types d'IFN modulent ainsi un réseau signalétique complexe permettant d'activer l'expression de plusieurs centaines de gènes en même temps. L'ensemble de cette cascade de signalisation repose sur l'activation des facteurs de transcription STAT, et notamment STAT1, véritable effecteur de la voie des IFN.

2) Description de la protéine STAT1

Des insectes jusqu'aux mammifères, la fonction de STAT1 et de la voie des IFN s'avère être essentielle à l'homéostasie cellulaire et tissulaire, ainsi qu'au maintien de l'intégrité de l'organisme. La protéine STAT1 fait partie de la famille des facteurs de transcription STAT, contenant 7 membres chez l'homme, qui possèdent une structure bien conservée composée de différents domaines (Bromberg and Darnell, 2000). La région C-terminale des protéines STATs possèdent de nombreux éléments clés nécessaires pour leur activation et leur fonction (Shuai et al., 1994; Wen and Darnell, 1997). En effet, les protéines de la famille STAT possèdent en C-terminal deux domaines majeurs : un domaine SH2 (Src-homology 2) impliqué dans les interactions protéine-protéine *via* des interactions directes entre les phosphotyrosines spécifiques, et un domaine de transactivation impliqué dans l'activation transcriptionnelle. Dans leur partie N-terminale, on retrouve un domaine de liaison à l'ADN (DNA binding domain) et une région nécessaire à l'oligomérisation des dimères de STAT fixés à l'ADN (Horvath et al., 1995; Xu et al., 1996). STAT1 possède également un motif NLS (Nuclear Localisation Sequence) qui est pris en charge par les importines α et β . Le NLS de STAT1 est localisé dans son domaine DBD et n'est utilisé que lorsque STAT1 est dimérisé (Fagerlund et al., 2002; McBride et al., 2002; Melen et al., 2001).

D'un point de vue fonctionnel, STAT1 joue un rôle pivot essentiel dans la réponse immune aux virus, aux bactéries et aux parasites. Ainsi les souris *Stat1*^{-/-} sont incapables de répondre à l'IFN et sont sensibles aux infections bactérienne et virales (Durbin et al., 1996; Meraz et al., 1996). Chez l'homme, il a été démontré que des mutations de la protéine STAT1 qui interfèrent avec ses fonctions sont associées à une hypersensibilité aux infections bactériennes et que des mutations conduisant à une absence de la protéine corrélaient avec une hypersensibilité aux maladies virales. Par ailleurs, STAT1 est un régulateur négatif de la tumorigénèse, l'angiogénèse et la formation des métastases (Battle et al., 2006; Huang et al., 2002). En effet, il a été démontré que les modèles murins déficients pour STAT1 forment des tumeurs spontanées beaucoup plus souvent que chez les souris sauvages, définissant ainsi STAT1 comme un suppresseur de tumeurs. Cette fonction est particulièrement altérée lors de la tumorigénèse mammaire puisque la perte de STAT1 est un événement fréquemment observé durant la progression des cancers du sein humains. De même, les souris *Stat1*^{-/-} développent spontanément des adénocarcinomes mammaires dont le phénotype récapitule la biologie des cancers du sein de type luminal ER α ⁺ chez la femme (Chan et al., 2012).

Cet effet négatif de STAT1 sur la prolifération cellulaire provient notamment du fait qu'il régule l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire tels que p21waf1 et p27kip1 qui inhibent l'activité des CDK (Cyclin Dependant Kinase) induisant alors un arrêt du cycle (Chin et al., 1996; Dimberg et al., 2003; Gooch et al., 2000). STAT1 induit également l'expression des procaspases, les formes des caspases latentes qui vont induire l'apoptose. De plus, le gène pro-apoptotique *Fas* est induit en réponse à l'IFN γ dans les cellules d'adénocarcinomes du colon, les cellules microgliales et les fibroblastes. L'activation de STAT1 conduit également à l'inhibition des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-x et stimule la voie apoptotique du TNF- α en interagissant avec TRADD qui inhibe l'activation de NF- κ B (Stephanou et al., 2000; Wesemann et al., 2004; Xu et al., 1998). Enfin, STAT1 interagit également avec p53, un régulateur majeur de l'apoptose et du cycle cellulaire, stimulant alors son activité transcriptionnelle et inhibant l'expression de son inhibiteur Mdm2 (Townsend et al., 2004).

Chez la drosophile et d'autres insectes, un homologue nommé STAT92E correspondant aux membres de la famille STAT des vertébrés a été identifié (Hou et al., 1996; Yan et al., 1996). Il a également été montré l'existence d'un récepteur transmembranaire nommé domeless, proche des récepteurs à cytokines des vertébrés, associé à une seule kinase nommée hopscotch (Binari and Perrimon, 1994; H.-W. Chen et al., 2002; Perrimon and Mahowald, 1986). Comme chez les mammifères, cette voie JAK/STAT sommaire a été impliquée dans le contrôle de la réponse immunitaire liée aux infections virales et au stress (Dostert et al., 2005; Ekengren and Hultmark, 2001). STAT92E a également été dans de nombreux processus tels que le développement embryonnaire et la segmentation, l'organogenèse, l'hématopoïèse larvaire et le maintien de la pluripotence des cellules souches (Zeidler et al., 2000).

3) Régulation de l'activité de STAT1

(a) Inhibiteurs de son activité

Comme nous avons pu le voir, la protéine STAT1 induit l'expression de gènes qui peuvent avoir de lourds effets sur les cellules et l'organisme. Son activité doit donc être transitoire et finement régulée par différents mécanismes permettant son inactivation. Divers régulateurs interviennent en inhibant notamment l'activité des kinases JAK dans le cytoplasme ou en inhibant STAT1 activé dans le noyau (Levy and Darnell, 2002). On trouve alors les SOCS

(Suppressors Of Cytokine Signaling) qui interagissent *via* leur domaine SH2, avec le domaine kinase des JAK ou avec le résidu tyrosine phosphorylé de la région cytoplasmique des récepteurs, inhibant ainsi la phosphorylation de STAT1 (Alexander and Hilton, 2004). En plus des SOCS, des phosphatases nucléaires vont permettre la déphosphorylation de la protéine STAT1 entraînant alors son export vers le cytoplasme (Haspel et al., 1996; Kim and Maniatis, 1996). L'export de STAT1 fait intervenir un élément NES (Nuclear Export Sequence) situé dans son domaine DBD (McBride et al., 2002). On retrouve également des protéines inhibitrices de STAT1 telle que PIAS1 (Protein Inhibitor of Activated STAT1) qui agit dans le noyau en interagissant avec STAT1 phosphorylé, empêchant ainsi sa liaison à l'ADN (B. Liu et al., 1998; Shuai and Liu, 2005).

(b) Les modifications post-transcriptionnelles

La première modification décrite et la mieux caractérisée est la phosphorylation de STAT1 sur sa Tyrosine 701 qui est nécessaire à sa dimérisation, à son import nucléaire et à sa fixation sur les séquences promotrices. La Sérine 727 est également phosphorylée et s'avère influencer la magnitude de l'activité transcriptionnelle de STAT1 (Kovarik et al., 2001). Bien que cette phosphorylation ne soit pas requise pour une activation complète de STAT1, elle est toutefois nécessaire pour l'activation de l'expression de certains gènes cibles de STAT1 (Pilz et al., 2003). Il est à noter l'existence d'une fraction de STAT1 non phosphorylée (U-STAT1) qui est détectée dans le noyau et possède une activité transcriptionnelle (Yang and Stark, 2008). U-STAT1 s'avère particulièrement requis pour prolonger l'expression d'une série de gènes de réponse à l'IFN (Chatterjee-Kishore et al., 2000; Cheon and Stark, 2009).

En dehors de la phosphorylation, il a été montré que STAT1 est méthylé sur son arginine R31 par l'enzyme PRMT1 afin de réguler la formation de dimères (Mowen et al., 2001). Bien que controversée, la méthylation de R31 a été rapportée par d'autres groupes et pourrait inhiber l'interaction de STAT1 avec PIAS (Komyod et al., 2005; Meissner et al., 2004; Stark and Darnell, 2012). En parallèle, PIAS1 catalyse la SUMOylation de STAT1 sur la lysine K703, ce qui inhibe son activation et réprime la formation d'agrégats nucléaire de STAT1 phosphorylés (Droescher et al., 2011; Shuai, 2006; Tahk et al., 2007; Ungureanu et al., 2005). Ces agrégats dits « paracristallins » semblent protéger la fraction phosphorylée de STAT1 de la déphosphorylation, afin de prolonger son activité transcriptionnelle (Droescher et al., 2011).

Par ailleurs, la fraction nucléaire activée de STAT1 est acétylée par l'histone acétyltransférase CBP sur les résidus lysines K410 et K413 localisés dans le DBD, favorisant la déphosphorylation de la Tyr 701 (Krämer et al., 2009). En effet, STAT1 acétylé va interagir avec la tyrosine phosphatase TCP45, conduisant à sa déphosphorylation et à son export dans le cytoplasme où il sera déacétylé par HDAC4 (Kramer et al., 2009). Bien que cette observation ait été controversée par une étude récente (Antunes et al., 2011), de nombreux groupes ont également rapporté l'existence de l'acétylation de STAT1 (Stronach et al., 2011; Zhuang, 2013).

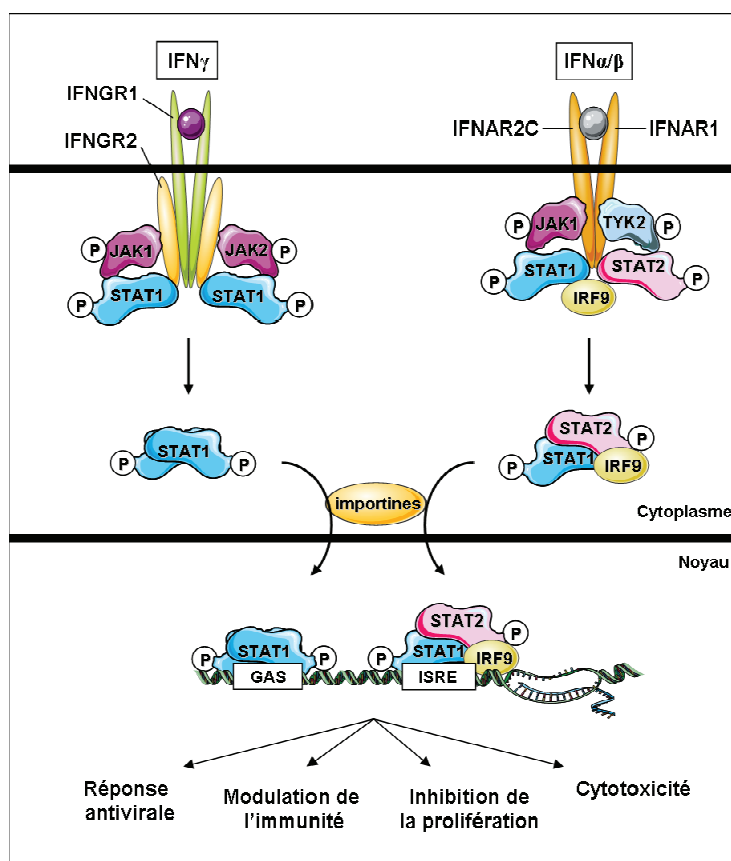


Figure 25 : Voie de signalisation canonique des interférons. L'IFN γ se fixe sur un récepteur constitué de 2 chaînes trans-membranaires IFNGR1 et 2 chaînes IFNGR2. Il y a alors autophosphorylation de JAK2 qui phosphoryle à son tour JAK1. Les 2 kinases phosphorylent les récepteurs, ainsi que le facteur de transcription STAT1. Après phosphorylation, STAT1 s'homodimérise pour migrer dans le noyau dépendamment des importines et se fixer sur des séquences GAS (IFN-Gamma activated sequence). De même, l'IFN α ou β se fixe sur un récepteur membranaire constitué d'un hétédimère IFNAR1-IFNAR2C, les kinases JAK1 et TYK2 se phosphorylent mutuellement puis phosphorylent les récepteurs ainsi que les facteurs STAT1 et STAT2. L'hétérodimère STAT1-STAT2 phosphorylé s'associe à IRF9 pour former un complexe transcriptionnellement actif qui est transloqué dans le noyau pour se fixer sur des séquences ISRE (IFN-sensitive response element).

C. Résumé des résultats obtenus

1) Caractérisation des cellules invalidées pour hCAF1

L'un des objectifs initiaux a été de caractériser les gènes régulés par hCAF1 grâce à l'étude transcriptomique réalisée dans les cellules invalidées pour hCAF1 (appelée « hCAF1^{kd} », kd : knock-down). La comparaison des profils d'expression entre les cellules hCAF1^{kd} et des cellules exprimant un microARN ne ciblant aucun transcrit humain (appelée « mock ») a permis l'identification d'une centaine de gènes surexprimés suite à l'inactivation stable de hCAF1 et une vingtaine de gènes inhibés. Cette étude à grande échelle a constitué le point de départ de mon projet de thèse. Parmi les gènes surexprimés, nous avons retrouvé une majorité de gènes inductibles par la voie des Interférons (IFN) tel que STAT1, IFI27, IFI6, IRF9, IFITM1. Ces résultats sont particulièrement importants car identifient pour la première fois une voie de signalisation régulée par la protéine hCAF1.

La surexpression des gènes de réponse à l'IFN a été validée en RT-PCR quantitative à partir des cellules contrôle et hCAF1^{kd}, ainsi que dans les cellules MCF7 et HeLa dans lesquelles l'expression de hCAF1 était inhibée de façon transitoire par des siARN. Après réexpression exogène de la protéine mCAF1 (non ciblée par les miRNA) dans les populations hCAF1^{kd}, nous avons mis en évidence une nette restauration de l'expression basale des gènes de réponse à l'IFN. La fonctionnalité et la robustesse de la réponse IFN générée par l'absence de hCAF1 ont été validées *via* des tests d'infection virale sur les populations cellulaires étudiées. Nous avons ainsi caractérisé une sévère inhibition de la réplication du virus de Sendai dans les cellules invalidées pour hCAF1. En parallèle, des tests de prolifération ont permis de mettre en évidence que l'invalidation de hCAF1 réduit la croissance des cellules MCF7. De la même façon, le double marquage à l'Annexine V et à l'Iodure de Propidium, nous a permis de démontrer que les cellules hCAF1^{kd} présentent un taux d'apoptose plus élevé que les cellules contrôles.

2) Implication dans la dégradation des ARNm

hCAF1 possède une activité déadénylase. Nous avons donc étudié la stabilité des ARNm de certains des gènes identifiés en microarray en utilisant l'inhibiteur de la transcription actinomycine D. Il s'est avéré que l'inactivation de hCAF1 stabilise une partie des transcrits analysés. En particulier, la demi-vie des transcrits des gènes Ifi27, Ifi6, Irf9, Ifitm1 est

sensiblement augmentée dans les populations où hCAF1 est inhibée par rapport aux cellules contrôles. Par contre, la stabilité du transcrit de STAT1 s'avère être peu affectée par l'absence de hCAF1, indiquant que l'accumulation de cet ARNm dépend d'un mécanisme distinct. Cette observation est particulièrement intéressante puisqu'elle indique que les gènes activés suite à l'inhibition de hCAF1 sont régulés par différents mécanismes.

3) Effet de l'inhibition de hCAF1 sur l'activité de STAT1

Il est important de souligner que les gènes «interféron inductibles» identifiés dans notre étude, y compris STAT1, sont les cibles transcriptionnelles de STAT1. Ce facteur représente le véritable effecteur de la cascade signalétique des interférons. Ces derniers vont activer STAT1 *via* une phosphorylation qui permet sa translocation nucléaire, sa liaison à l'ADN et l'activation de ses gènes cibles. Nos résultats indiquent que l'inhibition de hCAF1 induit une forte augmentation de l'activité transcriptionnelle de STAT1. Dans les cellules où l'expression de hCAF1 est inhibée et en absence d'IFN, nous avons ainsi démontré :

- la présence illégitime de STAT1 dans le noyau de ces cellules (microscopie confocale)
- une forte activation du gène de la luciférase placé sous le contrôle de STAT1 (essais transcriptionnels)
- l'ouverture de la chromatine au niveau du promoteur du gène Ifi27 (test d'accessibilité de la chromatine par une endonucléase)
- la présence de STAT1 au niveau des promoteurs de ses gènes cibles, associée à une hyperacétylation de l'histone H4 (Immunoprécipitation de chromatine)

A l'inverse, la surexpression de hCAF1 dans des cellules MCF7 réduit l'accumulation des transcrits produits lors d'une stimulation par l'IFN, confirmant le rôle de répresseur de hCAF1 vis-à-vis de la signalisation de STAT1.

4) hCAF1, un nouveau partenaire de STAT1

De façon intéressante, des expériences de “*in situ* proximity ligation assay (PLA)”, une technologie qui permet de visualiser en microscopie des interactions protéine-protéine dans les cellules, nous ont permis de révéler l'existence d'une interaction entre les protéines hCAF1 et STAT1 dans différentes lignées cellulaires (MCF7, HeLa, U937). En absence de signal d'activation, l'interaction entre les protéines endogènes hCAF1 et STAT1 est ainsi visualisée sous forme de spots dans le cytoplasme des cellules MCF7. Le marquage est significativement plus faible après traitement avec l'IFN, indiquant que l'activation de STAT1 déstabilise

l'interaction. L'association hCAF1-STAT1 a été confirmée par des tests *in vitro* et par co-immunoprécipitation.

5) Modèle proposé

Ces résultats nous ont conduit à postuler un mécanisme selon lequel en absence de stimulation hCAF1 interagit avec STAT1 et le séquestre dans le cytoplasme dans un état latent empêchant sa stimulation inappropriée. En présence d'IFN, STAT1 phosphorylé se dissocie de hCAF1, migre dans le noyau et active la transcription de ses gènes cibles. La magnitude et la durée de la réponse interféron doit être finement régulée car des activations anormales de ces voies sont associées à de nombreuses pathologies telles que le cancer. hCAF1 pourrait aussi participer à l'extinction du signal *via* son activité déadénylase qui entraînerait la dégradation rapide des transcrits. Dans les cellules où hCAF1 est inhibée, la protéine STAT1 sans stimulation, non phosphorylé et libre dans le cytoplasme, pourrait aller dans le noyau et activer ses gènes cibles. Une boucle d'auto-amplification de ces transcrits serait due au fait qu'en absence de hCAF1, principale déadénylase de la cellule, ils ne seraient plus dégradés.



hCAF1/CNOT7 regulates interferon signalling by targeting STAT1

Clément Chapat^{1,2,3,6},
Chloé Kolytcheff^{1,2,3,6}, Muriel Le
Romancer^{1,2,3}, Didier Auboeuf^{1,2},
Pierre De La Grange⁴, Kamel Chettab^{1,2,3},
Stéphanie Sentis^{1,2,3,5} and
Laura Corbo^{1,2,3,*}

¹Universit   Lyon 1, Lyon, France, ²Inserm U1052, CNRS UMR 5286, Cancer Research Center of Lyon, Centre Léon Bérard, Lyon, France, ³Equipe Labellis  e « La Ligue », Lyon, France, ⁴GenoSplice Technology, IUH, Centre Hayem, Saint-Louis Hospital-1, Paris and ⁵Facult   de Pharmacie de Lyon, ISPB, Université Lyon 1, Lyon, France

Stringent regulation of the interferon (IFN) signalling pathway is essential for maintaining the immune response to pathogens and tumours. The transcription factor STAT1 is a crucial mediator of this response. Here, we show that hCAF1/CNOT7 regulates class I and II IFN pathways at different crucial steps. In resting cells, hCAF1 can control STAT1 trafficking by interacting with the latent form of STAT1 in the cytoplasm. IFN treatment induces STAT1 release, suggesting that hCAF1 may shield cytoplasmic STAT1 from undesirable stimulation. Consistently, hCAF1 silencing enhances STAT1 basal promoter occupancy associated with increased expression of a subset of STAT1-regulated genes. Consequently, hCAF1 knockdown cells exhibit an increased protection against viral infection and reduced viral replication. Furthermore, hCAF1 participates in the extinction of the IFN signal, through its deadenylase activity, by speeding up the degradation of some STAT1-regulated mRNAs. Since abnormal and unbalanced JAK/STAT activation is associated with immune disorders and cancer, hCAF1 could play a major role in innate immunity and oncogenesis, contributing to tumour escape. *The EMBO Journal* (2013) 32, 688–700. doi:10.1038/emboj.2013.11; Published online 5 February 2013
Subject Categories: signal transduction; RNA; immunology
Keywords: CCR4–NOT; deadenylation; hCAF1/CNOT7; interferon signalling; STAT1

Introduction

The CCR4–NOT complex is an evolutionarily conserved multi-subunit complex that regulates several aspects of eukaryotic gene expression, including the repression and activation of mRNA translation, control of mRNA elongation, deadenylation and subsequent degradation of mRNA and

even protein degradation (for review, see Collart and Panasenko, 2012 and Miller and Reese, 2012). Deadenylase (Tucker *et al*, 2001) and E3 ubiquitin ligase (Panasenko and Collart, 2011) are two enzymatic activities that have been described for different subunits of the CCR4–NOT complex and could mediate most of its functions. The CAF1 and CCR4 subunits were initially identified as the major cytoplasmic deadenylases in budding yeast. Homologues of these proteins have been identified in Metazoa, indicating that this mRNA degradation pathway is evolutionarily conserved (Denis and Chen, 2003; Bianchin *et al*, 2005; Bartlam and Yamamoto, 2010). Both proteins have been shown to localize to cytoplasmic P-bodies with translationally repressed mRNA and miRNAs (Jakymiw *et al*, 2005; Pillai, 2005; Eulalio *et al*, 2009). CAF1 deadenylase activity has been shown to be responsible, at least in part, for miRNA-mediated gene repression (Behm-Ansmant *et al*, 2006; Eulalio *et al*, 2009; Fabian *et al*, 2009). Furthermore, mammalian CAF1 appears to be a crucial partner of the antiproliferative BTG/TOB proteins (Bogdan *et al*, 1998; Rouault *et al*, 1998; Ikematsu *et al*, 1999; Prevot *et al*, 2001) that are also implicated in mRNA turnover (Ezzeddine *et al*, 2007; Mauxion *et al*, 2008). hCAF1 has also been described to regulate transcription of several nuclear receptors (Prevot *et al*, 2001; Garapaty *et al*, 2008; Aslam *et al*, 2009) and the activity of the protein arginine methyl transferase PRMT1 (Robin-Lespinasse *et al*, 2007).

The biological role of CAF1 has been examined in a range of eukaryotic species. In yeast, caf1-deleted strains are sensitive to high temperatures and caffeine (Hata *et al*, 1998). In *C. elegans*, CAF1 is essential for embryonic and larval development (Molin and Puisieux, 2005). Additionally, CAF1 is required for normal growth of trypanosomes (Schwede *et al*, 2009). Mice that lack CAF1 are infertile due to impaired maturation of spermatogenic cells resulting in multiple defects during spermatid differentiation (Berthet *et al*, 2004; Nakamura *et al*, 2004). In plants, CAF1 has been shown to be involved in both development and response to biotic stresses. The Arabidopsis CAF1-like gene regulates the deadenylation of stress responsive mRNAs and plant defence responses to pathogen infection (Liang *et al*, 2009). Despite considerable progress in the understanding of CAF1-mediated regulation of gene expression, the physiological targets and the specific pathways by which it exerts its functions remain unclear.

In this study, we found that hCAF1 physically interacts with STAT1 and negatively regulates interferon (IFN)/STAT1 signalling by acting at different crucial steps of this pathway. Accordingly, hCAF1 depletion resulted in a hyper-activated subset of STAT1-regulated genes that led to retarded cell growth and an enhanced response to viral infection.

Results

hCAF1 regulates IFN-inducible genes

To identify novel cellular pathways regulated by hCAF1, we first ascertained its physiologically relevant targets. As a

*Corresponding author. Inserm U1052, CNRS UMR 5286, Cancer Research Center of Lyon, Université Lyon 1, Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec, 69373 Lyon Cedex 08, France. Tel.: +33 4 78 78 26 91; Fax: +33 4 78 78 27 20; E-mail: laura.corbo@lyon.univcancer.fr
⁶These authors contributed equally to this work.

Received: 17 August 2012; accepted: 4 January 2013; published online: 5 February 2013

starting point, we knocked down hCAF1 in the human cell line MCF7. We produced BLOCK-iT Pol II miR RNAi vectors expressing specific miRNAs targeting hCAF1 (kd and kd-1) and we used a non-specific miRNA (mock) as a control. As shown in Figure 1A, the residual levels of hCAF1 mRNA and protein in depleted cells were about 25% in hCAF1 knockdown cells (hCAF1^{kd}) and 50% in hCAF1 knockdown 1 cells (hCAF1^{kd-1}) compared to control mock cells. hCAF1 depletion was also confirmed by immunofluorescence. In control

cells, hCAF1 localized in both the cytoplasm and nuclear speckles as previously described (Robin-Lespinasse *et al*, 2007) (Figure 1Ba) and we observed decreased staining in hCAF1^{kd-1} and hCAF1^{kd} cells (Figures 1Bb and c).

We utilized microarray analysis to identify any hCAF1-regulated genes, comparing the gene expression profiles of hCAF1^{kd} cells and mock cells. With a cutoff of 1.5 for fold change and 0.05 for the *P*-value, the analysis of expression data showed that the most differentially expressed genes

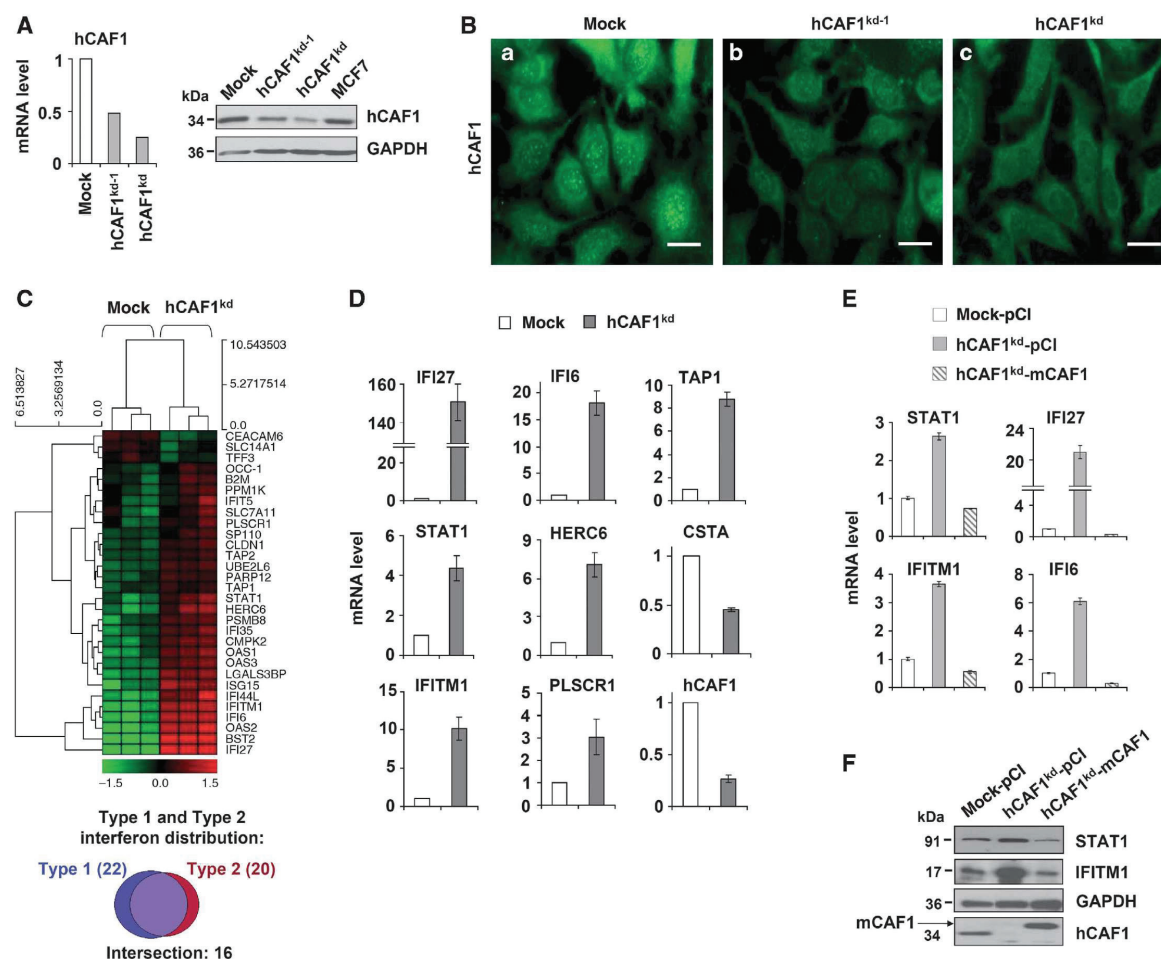


Figure 1 Characterization of hCAF1-depleted cells. MCF7 cells were transfected with vectors expressing control miRNA (mock) or with two alternative miRNAs (called kd, and kd-1) targeting hCAF1. After vector transfection and selection, mock, hCAF1^{kd} and hCAF1^{kd-1} cells were obtained. Total RNA or protein extracts were prepared to test hCAF1 knockdown efficiency. (A) Left panel, SYBR green real-time RT-PCR analysis was performed for detection of transcript levels of hCAF1. Results were normalized using 36B4 mRNA level as an internal control. Transcript levels in control cells (mock) were set to 1. Right panel, hCAF1 protein levels were analysed by western blot from 30 μg of protein extracts. (B) Endogenous hCAF1 expression and localization in hCAF1^{kd} and hCAF1^{kd-1} compared to the mock control, by Immunofluorescent staining using mouse polyclonal anti-CAF1 antibody and goat anti-mouse Alexa 488-conjugated secondary antibody (green). Scale bar = 20 μm. (C) Upper: summary of Human Exon 1.0 ST Array analysis results. Diagram of the hierarchical clustering of gene expression profiles of control versus hCAF1-deficient hCAF1^{kd} cell lines. Probes are represented vertically, whereas conditions are shown horizontally. Lower: type I and II interferon distribution by ISG Database. (D) Validation of the DNA array screen. SYBR green RT-qPCR analysis of the upregulated gene products IFI27, IFI6, TAP1, STAT1, IFITM1, HERC6, PLSCR1 and the downregulated gene CSTA. Total RNA isolated from mock and hCAF1^{kd} cells was reverse transcribed, and PCR was performed with primers specific for the transcripts of the indicated genes. Gene expression levels were normalized to internal controls 36B4 and shown as expression levels of hCAF1^{kd} cells relative to expression levels in control cells (arbitrarily set to 1). (E, F) Rescue of hCAF1 functions in knockdown cells. hCAF1^{kd} cells were stably transfected with a plasmid expressing mouse flag CAF1 (insensitive to miRNAs), or with the empty vector used as a control. (E) The expression of the indicated genes was analysed by real-time RT-qPCR as in (D). (F) Efficiency of flag mCAF1 overexpression and the protein expression of the indicated hCAF1-regulated genes was assessed by western blot. The experiments illustrated in (D) and (E) were performed in triplicate and expressed as mean values of three independent experiments. Standard deviations are shown. Source data for this figure is available on the online supplementary information page.

were upregulated in hCAF1 knockdown cells, consistent with hCAF1 acting as a repressor of gene expression (gene lists in Supplementary Table 1). We analysed gene co-occurrence in common biological functions and found that about 40% of upregulated transcripts encoded proteins involved in IFN-mediated immunity (Supplementary Table 2). Finally, a comparison between the list of genes upregulated after hCAF1 depletion and the ISG Database (<http://www.interferome.org>) showed that over 50% of the upregulated genes corresponded to genes involved in both type I (α and β) and type II (γ) IFN signalling pathways (Figure 1C, lower panel). Using RNA from mock and hCAF1^{kd} cells, we confirmed the microarray results on a subset of hCAF1-target genes by RT-qPCR (Figure 1D). We also obtained similar results in MCF7 cells transiently depleted of hCAF1 by two independent small-interfering RNAs (siRNAs) targeting different regions of hCAF1 mRNA (Supplementary Figure 1A). To rule out the possibility of off-target effects and further confirm the specificity of the silencing, we expressed a tagged form of mouse CAF1 cDNA (flag-mCAF1) (resistant to miRNA silencing) in hCAF1^{kd} and control cells. In this rescue experiment, we found that the expression of mCAF1 restored the expression of several genes upregulated by hCAF1 knockdown, almost to wild-type levels (Figure 1E). Overexpression and rescue of STAT1 and IFITM1 were also confirmed at the protein level (Figure 1F). Altogether, these data demonstrate that the effects of hCAF1 depletion are specific and reversible.

Physiological outcome of hCAF1 knockdown

We then investigated the physiological consequence of the negative regulation on IFN signalling caused by hCAF1. hCAF1^{kd} cells exhibited reduced growth rates, as measured by the Uptibblue assay (Figure 2A), and the number of cells in early apoptosis increased (Annexin V positive) compared to control (Figure 2B).

Since hCAF1 depletion resulted in a strong upregulation of IFN-activated genes, we measured JAK/STAT1 signalling in hCAF1 knockdown cells using an IFN-responsive luciferase reporter gene (ISRE-Luc). As shown in Figure 2C (left panel), the reporter gene was markedly activated in these cells without IFN treatment compared to control cells. Interestingly, there was no increase in basal activation of ISRE-Luc in these cells, either after IFN treatment or infection by the Sendai virus (SeV). We confirmed the specificity of the response using the NF- κ B Luc reporter gene as a control (Figure 2C, right panel). Thus, the effect of hCAF1 knockdown is reminiscent of the phenomena induced by IFN treatment. This was further substantiated by the changes in the nuclear organization observed after hCAF1 knockdown. It has been largely described that IFN treatment induces a reorganization of PML nuclear bodies (PML NBs) (Everett and Chelbi-Alix, 2007), associated with transcriptionally active parts of the genome, which persist after transcriptional shutoff (Gialitakis *et al*, 2010). Therefore, we analysed PML NBs in hCAF1^{kd} cells by confocal immunofluorescence. In these cells, the PML NBs appeared increased in both number and size compared to the control cells (Figures 2Da and c).

Finally, to directly analyse whether hCAF1 is involved in IFN-dependent antiviral responses, we infected both hCAF1 knockdown and control cells with SeV. Viral replication was analysed by RT-qPCR of the viral genome at various time periods after infection. As shown in the left panel of

Figure 2E, viral replication was strongly inhibited in hCAF1 knockdown cells compared to mock cells. As viral infection did not affect growth and viability of hCAF1^{kd} either control cells (Figure 2E, right panel), hCAF1^{kd} cells exhibited an increased protection against viral infection.

Altogether, these results indicate that knockdown of hCAF1 mimics the IFN response and inhibits viral replication.

Differential effects of hCAF1 on the decay rates of IFN-responsive genes

Accumulating evidence indicates that hCAF1 can regulate gene expression at both transcriptional and post-transcriptional levels. Therefore to determine the molecular mechanism of how hCAF1 regulates IFN signalling, we tested whether the increased mRNA levels we observed by microarray analysis resulted, at least in part, from the loss of mRNA deadenylation, which led to the stabilization of transcripts. Thus, we measured the mRNA levels of several hCAF1-regulated genes before and after the treatment of hCAF1^{kd} and control cells with actinomycin D. We focused our analysis on STAT1 and the STAT1-regulated genes IFI27, IFITM1 and IFI6, involved in both type I and type II IFN signalling pathways. Figure 3A shows the results obtained after short times of treatment, (between 0 and 2 h) indicating that the stability of IFI27, IFITM1 and IFI6 mRNAs was clearly enhanced in hCAF1 knockdown cells compared to control cells. By contrast, the stability of STAT1 mRNA was not significantly different from that of control cells (Figure 3A). These results, confirmed at longer treatment times (Supplementary Figure S2), imply that hCAF1 regulates IFN-induced genes by different mechanisms besides the control of mRNA turnover.

Furthermore, hCAF1^{kd} cells show a reduced amount of P-bodies, which are specific cytoplasmic foci enriched in proteins involved in mRNA metabolism (Eulalio *et al*, 2007; Parker and Sheth, 2007) (Figure 3B compare a to b). This strongly indicates that deadenylation is impaired in hCAF1^{kd} cells as this function has been linked to the presence of P-bodies (Zheng *et al*, 2008).

hCAF1 affects the activation of the JAK/STAT pathway

STAT1 plays a pivotal role in both type I (α/β) and type II (γ) IFN signalling pathways (Bromberg and Darnell, Jr., 2000; Ramana *et al*, 2002). IFN binding to type I (α/β) and type II (γ) IFN receptors results in the dimerization of receptor complexes and the activation of the Janus family of protein tyrosine kinases (JAKs), followed by phosphorylation of latent, cytosolic STAT monomers. When phosphorylated, STATs form homodimers or heterodimers, move to the nucleus and activate the transcription of target genes (for reviews, see Bromberg *et al*, 2000; Ramana *et al*, 2000 and Levy and Darnell, Jr, 2002). Therefore, we examined whether activation of the JAK/STAT pathway was affected in hCAF1 knockdown cells. As shown in Figure 4A, in the absence of IFN stimulation, the level of STAT1 protein was consistently greater in hCAF1^{kd} cells than in control cells. Phosphorylation of STAT1 was not observed in either untreated cell line. After IFN α stimulation for the indicated times, the level of tyrosine 701 phosphorylation of STAT1 was monitored in hCAF1^{kd} cells with respect to control cells. p-STAT1 was detected after 2 h of treatment and then decreased over several hours in both hCAF1^{kd} and control

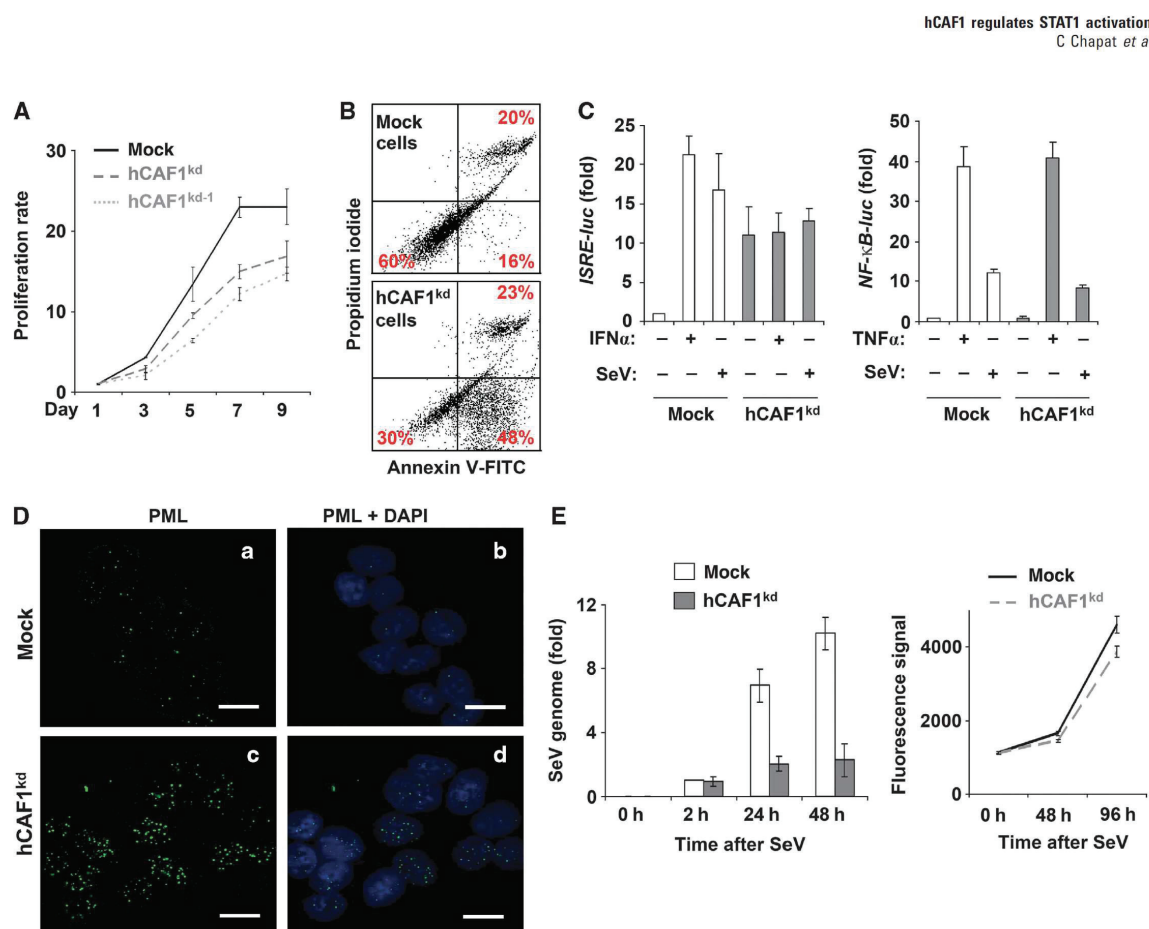


Figure 2 Physiological outcome of hCAF1 knockdown cells. (A) Cell growth of mock and hCAF1^{kd} cells was measured by the Uptibblue assay, and (B) apoptosis by using the Annexin-V-FITC assay. (C) Mock and hCAF1^{kd} cells transfected with the reporter plasmids ISRE-Luc (left panel) or with NF-κB-Luc (right panel). ISRE- and NF-κB-dependent luciferase activities were measured after treatment with IFNα or infection with Sendai virus (SeV) (left panel) or with TNFα or SeV (right panel), respectively. Luciferase activities were normalized to the activity of the internal control Renilla luciferase and expressed as activation relative to the basal level in mock control cells (arbitrarily set to 1). (D) Confocal fluorescence microscopy experiments using anti-PML antibodies on untreated mock (a, b) and hCAF1^{kd} cells (c, d). Scale bar = 20 μm. (E) Mock and hCAF1^{kd} cells were infected with SeV (left panel). The virus genome was quantified by RT-qPCR at the indicated times after the infection. Each set of experiments was performed in triplicate and repeated at least three times. Uptibblue Reagent was used to assess cell viability and cell proliferation of hCAF1^{kd} and mock cells after SeV infection (right panel). All the illustrated data were performed in triplicate and are expressed as mean values of three independent experiments. Standard deviations are shown.

cells. Notably, although the basal level of STAT1 protein was consistently greater in hCAF1^{kd} cells than in control cells, we observed a reduced phosphorylation of STAT1 in hCAF1^{kd} cells compared to control cells, indicating that only a fraction of STAT1 was activated by IFN treatment. This reduced amount of activated STAT1 is likely to be responsible for the transcriptional response of these cells to IFN. Indeed, concomitant to the decrease in p-STAT1, newly synthesized STAT1 appeared, beginning after about 8 h of IFNα treatment and accumulating at 24 h, in both hCAF1-depleted and control cells. The reduced phosphorylation of STAT1 was confirmed after IFNγ treatment and was more evident within a shorter time after activation (Supplementary Figure 3A). We next investigated the activation of STAT1-target genes in hCAF1^{kd} and mock cells treated with IFNα at various times. qPCR profiles confirmed that in the absence of IFN stimulation, the levels of STAT1, IFI27, IFI6 and IFITM1 transcripts were consistently greater in hCAF1^{kd} cells than in control cells (Figure 4B). In addition, these transcripts were not only

efficiently induced in response to IFN stimulation, their activation appeared earlier in hCAF1 knockdown cells compared to control cells (Figure 4B). Consistently, ectopic expression of hCAF1 in MCF7 cells delayed the expression of the STAT1-target genes IFI27 and IFITM1 in response to IFN stimulation (Figure 4C).

The subcellular localization of both endogenous STAT1 and p-STAT1 in hCAF1-depleted cells, compared with control cells, induced or not with IFN, was analysed by confocal fluorescence microscopy experiments. Figure 4Da shows that in the absence of IFN stimulation, STAT1 localized to the cytoplasm in control cells, as expected. IFN treatment induced a rapid nuclear translocation and phosphorylation of STAT1 as detected by anti-STAT1 (Figure 4Db) and anti-p-STAT1 (Figure 4Dc) antibodies. Interestingly, in untreated hCAF1^{kd} cells we observed that depletion of hCAF1 resulted in high expression of the protein STAT1, consistent with microarray results (Figure 4Dd). Even though a major amount of protein localized in the cytoplasm, STAT1 nuclear

hCAF1 regulates STAT1 activation C Chapat *et al*

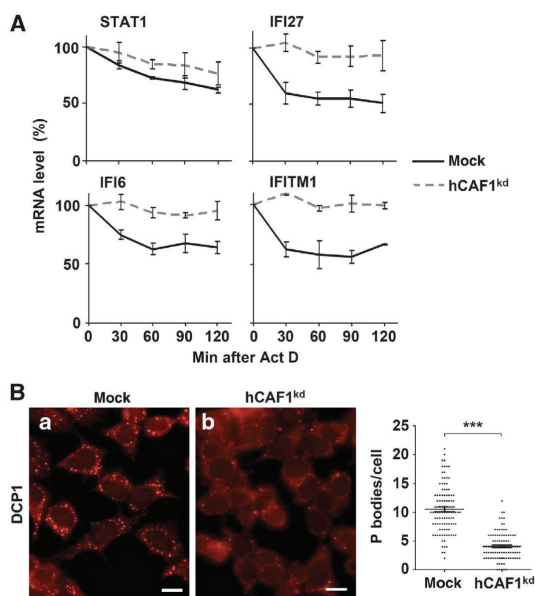


Figure 3 Determination of the stability of hCAF1-regulated genes. (A) Mock and hCAF1^{kd} cells were treated with Actinomycin D and total mRNA was isolated at the indicated times after treatment. mRNA levels of the indicated genes were determined by SYBR green real-time RT-PCR as described in Figure 1. Results were plotted as a function of time from drug addition. Results are expressed as mean values of at least three independent experiments. Standard deviations are shown. (B) Effect of hCAF1 knockdown on P-body formation, analysed using a rabbit antibody directed against Dcp1a. Fluorescence microscopy is representative of at least three independent experiments. Scale bar = 20 μ m. Quantification of the number of signals per cell ($n=100$) was performed (mean \pm s.e.m.) using Image J software. Student's *t*-test. *** $P<0.001$.

staining was still visible in these cells (Figure 4Dd). After IFN activation, only a fraction of the protein pool migrated to the nucleus (Figure 4De), and was phosphorylated (Figure 4Df), confirming the results shown in Figures 4A and B. We did not detect any p-STAT1 in either unstimulated control or hCAF1^{kd} cells (unpublished results). Taken together, these findings suggest that the effects of hCAF1 on IFN signalling are, at least in part, mediated by STAT1.

hCAF1 depletion affects STAT1 basal promoter occupancy

Previous work from several laboratories has shown that STAT1 can drive gene expression even in the absence of tyrosine phosphorylation (Chatterjee-Kishore *et al*, 2000; Yang and Stark, 2008). In particular, the group of G.R. Stark demonstrated that high expression of exogenous unphosphorylated STAT1 (u-STAT1) increases the expression of many immune regulatory genes (Cheon and Stark, 2009) reported to be upregulated in chemo- or radiation-resistant cancer cells and designated as the IFN-related DNA damage signature (Weichselbaum *et al*, 2008). Interestingly, many of these genes are also upregulated in hCAF1-depleted cells (see Supplementary Table 1). We postulated that the high amount of STAT1 protein could be responsible for the constitutive expression of its target

genes, in the absence of IFN induction. Indeed, in resting hCAF1^{kd} cells STAT1 was not phosphorylated (Figure 4A) and the expression of two transcriptional targets of p-STAT1, IRF1 and SOCS1, was not affected (Supplementary Figure 1B). To directly test this hypothesis, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays. We found a significant increase in STAT1 recruitment at both the STAT1 promoter and promoters of its target genes, *IFI27* and *IFITM1*, in hCAF1 knockdown cells relative to control cells, in the absence of IFN induction (Figure 5A). Interestingly, knockdown of hCAF1 also increased H4 total acetylation, a recognized hallmark of transcriptionally active chromatin (Kouzarides, 2007; Figure 5B). We did not observe any significant H4 acetylation in control cells at any of the promoters tested in the same conditions. STAT1 recruitment and H4 acetylation after IFN stimulation are shown in Supplementary Figures 4A and B. These results suggest that in hCAF1^{kd} cells the chromatin architecture of some STAT1-target promoters is permissive for transcription, in the absence of IFN activation. To test this hypothesis, we used a restriction enzyme hypersensitivity assay (REHA) to analyse changes in the chromatin architecture of the *IFI27* gene promoter, whose expression was strongly upregulated in hCAF1^{kd} cells. REHA allows a high-resolution analysis of changes in the chromatin architecture by assaying nucleosome remodelling, which is often a prerequisite for transcriptional activation (Sproul *et al*, 2005). hCAF1^{kd} and control cells were either exposed to IFN γ , or not, for 6 h. Isolated nuclei were then treated with a limiting concentration of PST1 restriction enzyme, which cuts near the STAT1-binding element in the *IFI27* promoter (Ni *et al*, 2005; Figure 5C). DNA was then purified and the level of intact DNA was determined by qPCR using oligos flanking the PST1 restriction site or control region (Figure 5C). As shown in Figure 5D, right panel, the RE accessibility was largely increased in untreated hCAF1^{kd} cells compared with control cells (left panel). Remarkably, the re-expression of mCAF1 in these cells (see Figure 5E) was sufficient to totally rescue the RE sensitivity phenotype (Figure 5E, right panel). These data indicate that STAT1 is recruited to the promoter of some of its target genes in unstimulated hCAF1^{kd} cells. This basal promoter occupancy is associated with a decondensation of chromatin on these promoters.

hCAF1 physically interacts with STAT1 in the cytoplasm of unstimulated cells

These results prompted us to investigate a possible physical interaction between hCAF1 and STAT1. Pull-down assays, using either GST-tagged hCAF1 or CCR4 (the preferential partner of CAF1), revealed a strong direct interaction of STAT1 with hCAF1 (Figure 6A). We did not detect any interactions between STAT1 and either CCR4 or GST. The interaction between endogenous hCAF1 and STAT1 was confirmed in both MCF7 and U937 cell lines. We incubated cellular lysates from MCF7 (Figure 6B) and U937 cells (Supplementary Figure 5) with anti-CAF1 polyclonal antibodies, resulting in co-immunoprecipitation of STAT1. The interaction between hCAF1 and STAT1 was strongly decreased when STAT1 was transiently depleted by siRNAs, compared to transfection with control siRNA (Figure 6B; Supplementary Figure 6B). Finally, the interaction between hCAF1 and STAT1 is most likely direct and not mediated by

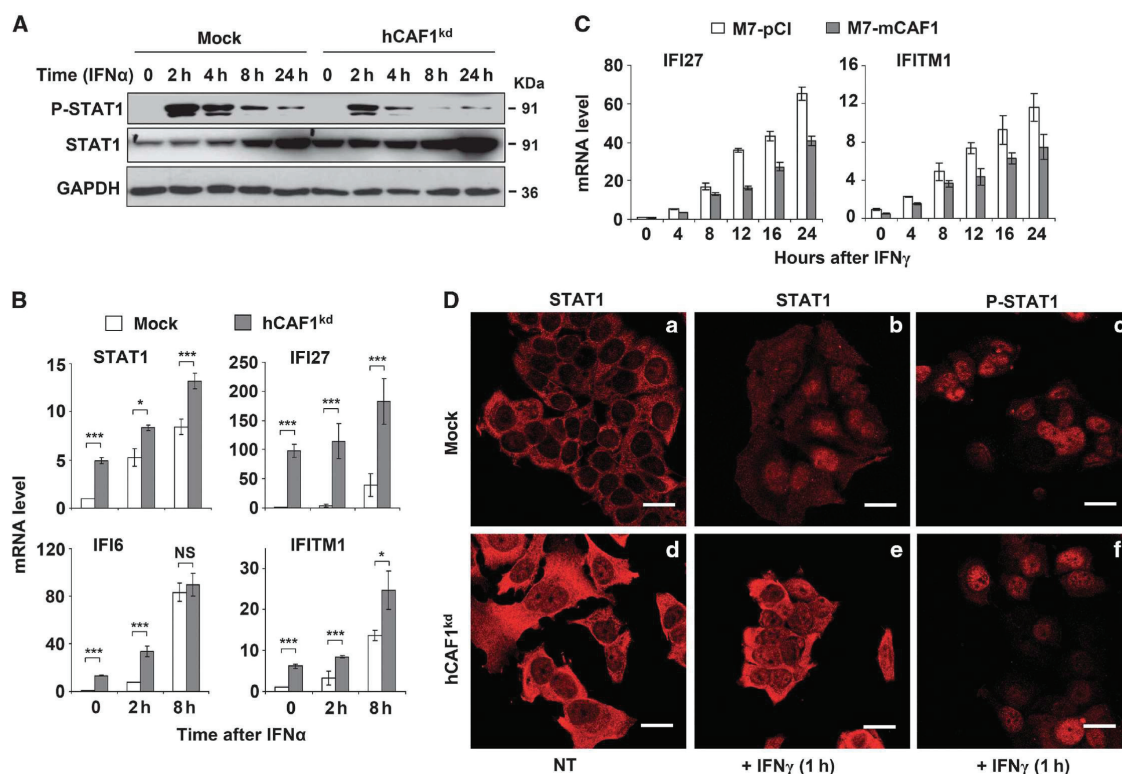


Figure 4 STAT1 activation in hCAF1 knockdown cells. (A) After IFN stimulation for the indicated times, the level of tyrosine 701 phosphorylation of STAT1 was measured in hCAF1^{kd} cells and control cells by western blot. (B, C) Kinetic induction of STAT1 and STAT1-target genes upon interferon stimulation for the indicated times in (B) hCAF1 knockdown and control cells and in (C) MCF7 cells stably expressing mCAF1 and control cells was analysed using quantitative PCR as described in Figure 1. The illustrated experiments were performed in triplicate, expressed as mean values of three independent experiments. Standard deviations are shown and the *P*-value was determined by Student's *t*-test: **P* < 0.05; ****P* < 0.001. (D) Confocal fluorescence microscopy experiments showing the subcellular distribution of endogenous STAT1 and p-STAT1 in hCAF1-depleted cells. Mock and hCAF1^{kd} cells were grown on coverslips into 12-well plates and treated with 5 ng/ml of IFNγ for 1 h. STAT1 and p-STAT1 were analysed by immunofluorescence. Scale bar = 20 μm. Source data for this figure is available on the online supplementary information page.

RNA because RNase treatment of MCF7 cell lysates did not affect their co-precipitation (Figure 6C).

To determine in which cellular compartment this interaction occurred and whether it was regulated by IFN induction, we used an *in situ* proximity ligation assay (PLA), a technology capable of detecting protein interactions and the localization of interactions with high specificity and sensitivity. In the absence of IFN, the discrete spot-like signals indicated the interaction between endogenous hCAF1 and STAT1, as shown in Figure 6Da. Importantly, since the image in Figure 6Da was recorded in the fixed plane, the localization of each spot inside the cell could be unclear. By imaging cells with confocal microscopy, Z-stack projections showed unambiguously that the interaction spots were exclusively localized in the cytoplasm of resting MCF7 cells (see Supplementary Figure 7; compare a reconstruction of a three-dimensional (3D) image in Supplementary Figure 7A to a single median section cutting the nucleus, in Supplementary Figure 7B).

The interaction spots were strongly decreased when STAT1 expression was knocked down using siRNA in MCF-7 cells compared to mock MCF7 cells transfected with control siRNA

(Figure 6E, compare panels a and b), supporting the specificity of this interaction. STAT1 knockdown efficiency was determined by qPCR analysis (Supplementary Figure 6B). Notably, IFNγ treatment (1 h) induced a visible and significant reduction in the signal, reflecting the dissociation of the hCAF1/STAT1 complex (Figure 6Db). Since the level of both proteins did not decrease after IFN treatment, hCAF1/STAT1 dissociation could be triggered by the phosphorylation and nuclear migration of STAT1 after IFN treatment, as shown in Figures 4Db and c. Importantly, the dynamic interaction between hCAF1 and STAT1 was confirmed in two different cellular models, HeLa and U937 cells (Supplementary Figure 8). Then we asked whether STAT1 interacted with other components of CCR4–NOT complex. Using immunoprecipitation assays we did not obtain convincing results, probably due to the lack of strong antibodies to detect co-immunoprecipitation of endogenous proteins or to a weak or indirect interaction (data not shown). Conversely, taking advantage of the high sensitivity of PLA technology, we detected the interaction of STAT1 with NOT1 on the cytoplasm of MCF7 cells (Supplementary Figure 9). Consistent with GST-pull down results (Figure 6A) we did not detect any

hCAF1 regulates STAT1 activation
C. Chapat *et al.*

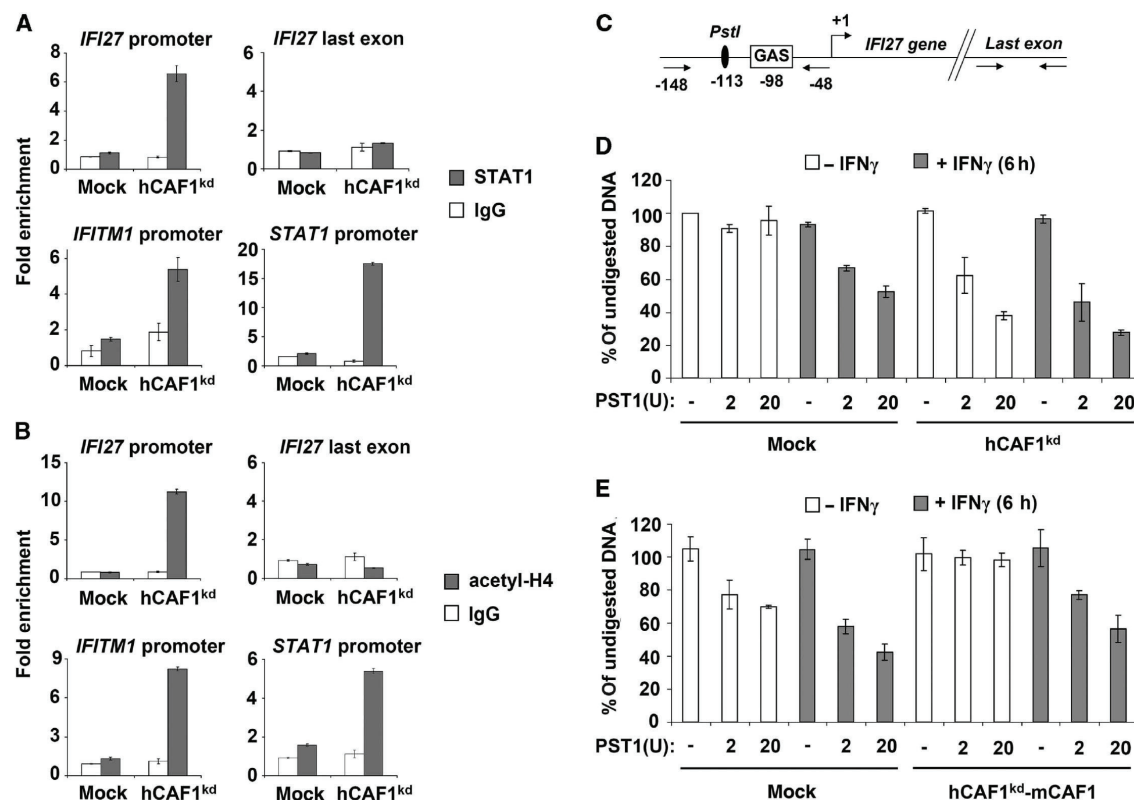


Figure 5 Constitutive recruitment of STAT1 at a subset of STAT1-target promoters in hCAF1 knockdown cells. ChIP assays of untreated hCAF1^{kd} and control cells were performed using antibodies anti-STAT1 (A) and anti-acetyl H4 (B). Enriched DNA fragments were quantified by qPCR using specific primers for the indicated promoters with respect to the input DNA and normalized to a reference locus (3' downstream region of the GAPDH gene). Rabbit IgGs were used as a negative control. (C–E) hCAF1 affects chromatin accessibility. (C) Schematic representation of GAS, PST1 site and primer positions on *IFI27* promoter. (D) hCAF1^{kd} and control cells and (E) hCAF1^{kd} transfected with empty pCiflag (mock) or with pCiflag-mCAF1 (hCAF1^{kd}-mCAF1, rescued cells expressing mCAF1) were exposed or not to IFN γ for 6 h. Isolated nuclei were then treated with a limiting concentration of PST1 restriction enzyme, which cut GAS containing region in *IFI27* promoter. DNA was then purified and the level of intact DNA was determined by qPCR using oligos flanking the GAS element or control region illustrated in (C). The experiments were performed in triplicate, expressed as mean values and are representative of at least three independent experiments. Standard deviations are shown.

direct interaction between STAT1 and CCR4 by PLA (data not shown).

Discussion

Living organisms are constantly exposed to a variety of internal and external stimuli. The innate immune system is genetically programmed to rapidly detect and respond to infection by viruses or other pathogens and to play a key role in immune surveillance of tumours (Dunn *et al.*, 2006). A successful innate immune response requires the action of type I or II IFNs and the activation, via phosphorylation, of latent cytosolic transcription factors, STATs, as crucial mediators of this response. When phosphorylated, STATs form homodimers or heterodimers, move to the nucleus and activate the transcription of target genes (Bromberg *et al.*, 2000; Ramana *et al.*, 2000; Levy *et al.*, 2002).

Although innate immunity is essential for host defence, aberrant activation of innate immune responses results in the development of autoimmune diseases and cancer. It is

therefore not unexpected that this signalling pathway is tightly regulated to avoid either deficient or excessive responses. In fact, the magnitude and degree of STAT signalling is regulated by various mechanisms, including post-translational protein modifications and interaction with regulatory proteins (Levy *et al.*, 2002).

In this report, we have defined a novel role for hCAF1 in the negative regulation of type I or II IFN signalling. Consistently, knockdown of hCAF1 renders cells more resistant to viral infection and reduced viral replication (Figure 2E).

Notably, we have found that hCAF1 forms a complex with the latent form of STAT1 in the cytoplasm of several cell lines (Figure 6Da; Supplementary Figures 7 and 8A and C). IFN treatment of cells induced the dissociation of the complex (Figure 6Db; Supplementary Figures 8B and C) permitting the release of STAT1 and its migration to the nucleus. Since the level of hCAF1 was not affected by IFN treatment (Supplementary Figure 3B), it is reasonable to attribute the dissociation of hCAF1/STAT1 complex to the

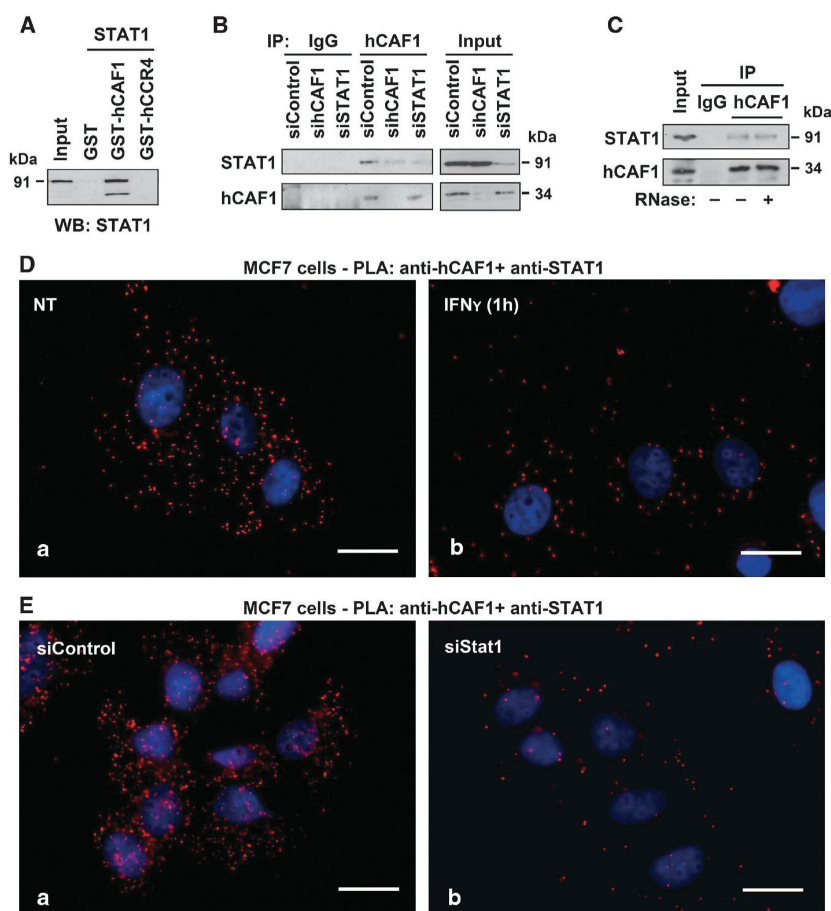


Figure 6 hCAF1 physically interacts with STAT1. (A) Direct interaction between hCAF1 and STAT1 was analysed by GST-pulldown experiments. *In vitro* translated STAT1 was incubated with equivalent amounts of GST, GST-CAF1 and GST-CCR4 (Supplementary Figure 5A) bound to glutathione-Sepharose beads. The eluted proteins were analysed by immunoblotting using anti-STAT1 antibody. (B) Endogenous hCAF1 and STAT1 interact. Extracts from MCF7 cells treated with STAT1 and hCAF1-specific siRNAs or control (siControl) siRNA were immunoprecipitated (IP) with either normal rabbit IgG or anti-hCAF1 antibody. Immunoprecipitates were then analysed by immunoblotting with anti-STAT1 antibody. (C) MCF7 protein extracts were treated with or without RNaseA before immunoprecipitation (IP) with an anti-hCAF1 antibody followed by western blot with anti-STAT1 antibody. (D) STAT1 and hCAF1 co-localize in the cytoplasm of the unstimulated MCF7 cells. MCF7 were grown on coverslips in 12-well plates and then treated with 5 ng/ml of Interferon γ for 1 h. Proximity Ligation Assay (PLA) was used to detect the cellular co-localization of endogenous hCAF1 and STAT1 according to manufacturer's instructions (Duolink, Eurogentech). (a) PLA using anti-hCAF1 and anti-STAT1 on untreated MCF7 cells and (b) MCF7 cells treated with 5 ng/ml of Interferon γ for 1 h. (E) PLA control on MCF7 cells transfected with (a) control siRNA or with (b) siRNA against STAT1. Data are representative of at least three independent experiments. Scale bar = 20 μ m. Source data for this figure is available on the online supplementary information page.

phosphorylation and consequent nuclear migration of STAT1 (Figures 4Da and c). These results suggest that the formation of this complex in the cytoplasm may prevent the inappropriate migration of STAT1 in unstimulated conditions. The phosphorylation of STAT1 on tyrosine 701, following IFN stimulation and JAK activation, is crucial for dimerization and nuclear migration. However, IFN treatment of hCAF1^{kd} cells reduced phosphorylation of STAT1 (Figure 4A), although we observed an increased amount of some STAT1-target transcripts (Figure 4B). It will be interesting to determine whether hCAF1 plays a role in the regulation of STAT1 phosphorylation and thereby its activation and migration.

Nuclear trafficking, which involves a complex combination of active and passive mechanisms and has a significant

impact on STAT functions, might constitute another important 'check-point' in IFN/STAT signalling. This idea is further supported by several lines of evidence. Knockdown of hCAF1 resulted in a high basal transcriptional activation of STAT1 and a subset of STAT1-regulated genes. Furthermore, our results showed a local decondensation of chromatin structure within some STAT1-target promoters associated with the recruitment of STAT1 and H4 hyperacetylation, in the absence of any induction (Figure 5). Figure 4A clearly shows that STAT1 is not phosphorylated in resting hCAF1^{kd} cells therefore we postulate that the constitutive expression of some STAT1-target genes in the absence of IFN induction, is, at least in part, consequent to the high concentration of STAT1 protein. However, the group of G.R. Stark has

demonstrated that the forced expression of exogenous u-STAT1 was linked with increased expression of a class of genes (Cheon *et al.*, 2009) previously reported to be upregulated in chemo- or radiation-resistant cancer cells overexpressing u-STAT1 (Weichselbaum *et al.*, 2008) and classified as 'IFN-related DNA damage signature' (Khodarev *et al.*, 2012). Interestingly, many of these genes are also upregulated in hCAF1-depleted cells (see Supplementary Table 1) indicating that hCAF1 can be potentially involved in cellular resistance to genotoxic stress and in prosurvival functions of STAT1. Overall, these data indicate that high amounts of u-STAT1 may, directly or not, affect the chromatin architecture of discrete genomic regions. One intriguing possibility is that u-STAT1, when overexpressed and in absence of stimuli, can migrate to the nucleus and associate with compacted chromatin on a class of IFN-inducible promoters, acting as a 'pioneer' factor. These bindings would increase accessibility for subsequent transcription factor recruitments, permitting the expression of a particular class of genes, which can confer, for example, the chemo- or radiation-resistant phenotype described for several types of tumours (Weichselbaum *et al.*, 2008). This effect can be reminiscent of the phenomena described for the HLA locus where IFN treatment induces rapid higher order chromatin modifications generating 'primed' transcriptionally permissive environment which facilitates subsequent inductions (Christova *et al.*, 2007). In line with this hypothesis, hCAF1 depletion also correlates with the re-organization of PML NBs, which have been associated with transcriptionally active 'memory' parts of the genome after the IFN response (Figure 2D).

On the other hand, a direct association between high expression of u-STAT1 and DNA damage-resistant phenotype has been described in *Drosophila*, in which u-STAT92E localizes on heterochromatin maintaining the stability of transcriptionally repressed heterochromatin (Shi *et al.*, 2008). Strikingly, animals with high levels of u-STAT92E exhibit increased levels of heterochromatin associated with increased survival rate after genotoxic stress (Yan *et al.*, 2011). We can imagine that u-STAT1 could also be able to silence specific domains of the genome by recruiting co-repressors, as described for several pioneer factors (Zaret and Carroll, 2011). As Jak/STAT1 signalling is one of mechanisms of the tumour cell elimination in early stages of many tumour development, we can hypothesize that tumour cells in 'secondary prolonged' response (Cheon *et al.*, 2009), associated with u-STAT1 transcription and primed chromatin, are more resistant to genotoxic stress and can be responsible for the selection of aggressive phenotype tumour clones.

The molecular events leading to the deregulation of STAT1 observed in hCAF1^{kd} cells are illustrated in Figure 7A. In the absence of hCAF1, a fraction of u-STAT1 migrates to the nucleus and induces the expression of STAT1 itself, thus creating a positive feedback loop that enhances its expression. In parallel, u-STAT1 stimulates the expression of several target products whose stability is prolonged by the loss of hCAF1 deadenylase activity in these cells, leading to their accumulation.

On the basis of our results we propose a model for a previously unpredictable mechanism regulating the functions of STAT1. In Figure 7B, we illustrate how hCAF1, through its interaction with STAT1, could regulate IFN signalling at

different crucial steps: (i) in resting unstimulated cells, by controlling STAT1 trafficking and (ii) in IFN-activated cells by participating to the extinction of IFN response (Figure 7B).

Despite we cannot rule out that hCAF1 interacts with and regulates STAT1 outside of the CCR4-NOT complex, increasing number of biochemical, genetic and structural studies point out that CAF1 protein, in yeast and mammalian cells, exists and acts within the CCR4-NOT multifunctional complex. Furthermore, the involvement of this complex in IFN-mediated gene activation is in agreement with its emerging role as a chaperone regulatory platform (Collart and Timmers, 2004). The CCR4-NOT complex, in addition to its housekeeping functions, can efficiently and rapidly adapt cellular gene expression in response to changes in environmental conditions and stimuli. The innate immune response to infection by viruses or other pathogens is in fact initiated by an induction phase which rapidly responds to external aggression, followed by a downregulation of the response. Since the CCR4-NOT complex acts at all levels of gene expression, from transcription to decay (mRNA or protein), it permits the rapid adaptation of cells to external stresses.

To prevent excessive responses to IFNs, hCAF1 could participate in the extinction of the IFN signal via its deadenylase activity, by accelerating the degradation of some STAT1-induced mRNAs. Notably, although CCR4/CAF1 deadenylase can potentially remove poly(A) tails from any mRNA species, hCAF1 knockdown differentially affected the stability of STAT1-induced transcripts. This selectivity could be explained by differential 'marks' of degradation on mRNAs, as theorized by Parker (Tucker *et al.*, 2001). The emerging idea that mRNAs are marked for degradation during transcription is supported by recent results from genome-wide gene expression, establishing that mRNA production and decay are strongly linked (Shalem *et al.*, 2011; Bregman *et al.*, 2011). Moreover, fast-induced responsive genes, as is the case for the STAT1-target genes, display a corresponding rapid destabilization of their mRNAs (Shalem *et al.*, 2008). Consistently, our previous data indicated that the different regulatory roles in which the CCR4-NOT complex is involved, notably transcription and mRNA turnover, may occur via distinct complexes, whose size, composition and cellular localization changes during the cell cycle (Morel *et al.*, 2003). Further studies may provide insight into the molecular mechanism determining and coordinating the rate of both mRNA synthesis and decay in IFN signalling. Focus on this pathway might be an appealing approach to explore how a simple complex, such as CCR4-NOT, can regulate an mRNA from 'birth to death'. These findings identify hCAF1 as a key factor in IFN-negative regulation playing a physiologically important role in the maintenance of immune homeostasis, especially with regard to regulation of the innate immune response. Since abnormal and unbalanced JAK/STAT activation is associated with immune disorders, cancer and cellular resistance to DNA-damaging agents, hCAF1 could play a major role in oncogenesis, contributing to tumour escape. Therefore, our results give the basis to decode the molecular properties and functions of u-STAT1 and the role of its increased expression in the selection of therapy-resistant cancer clones. Finally, hCAF1 and the CCR4-NOT complex have potential useful therapeutic targets for enhancing immunity against microbial infections and inflammation-associated diseases.

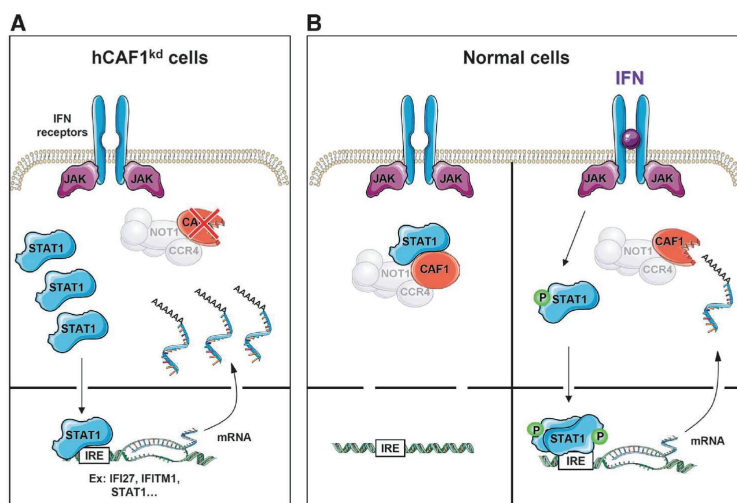


Figure 7 Model for dual regulatory functions of hCAF1 in IFN signalling. (A) In hCAF1^{kd} cells, hCAF1 depletion prevents the trapping of STAT1 in the cytoplasm, permitting that a fraction of u-STAT1 migrates in the nucleus and activates the expression of many target genes, including STAT1 itself. In parallel, u-STAT1 activates the expression of several target genes whose stability is prolonged and enhanced by the loss of hCAF1 deadenylase activity in these cells, leading to their accumulation. (B) Under physiological conditions and in the absence of IFN induction, hCAF1 can control STAT1 trafficking by interacting with the latent form of STAT1 in the cytoplasm. IFN activation leads to the release of STAT1 and its phosphorylation. Phosphorylated STAT1 forms homodimers or heterodimers, move to the nucleus and induce the transcription of target genes to allow rapid and transient activation of immune response signalling. hCAF1 could also participate in the extinction of IFN signal via its deadenylase activity by speeding up the degradation of several STAT1-regulated mRNAs, which may constitute new physiologically relevant targets of hCAF1. The light grey colour of the CCR4-NOT complex indicates that its participation is not yet completely established.

Materials and methods

Cell culture

MCF7, HeLa and stable cell lines were routinely maintained in DMEM, U937 in RPMI-1640, supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin/streptomycin in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C.

hCAF1 knockdown

We used BLOCK-iT Pol II miR RNAi Expression Vector Kits (Invitrogen) to generate vectors containing miRNA duplexes targeting hCAF1, corresponding to the coding regions 571–591 (Kd-1), and 941–961 (Kd-2) (hCAF1 NCBI Reference Sequence: NM_013354.5) and one non-targeting control miRNA (mock), following manufacturer's instructions. Cells expressing the miRNA of interest (called hCAF1^{kd}, hCAF1^{kd-1} and mock) were selected 48 h after vector transfections, in medium containing 5 µg/ml of blasticidin (Invitrogen) for at least 3 weeks, after which blasticidin concentration was reduced to 3 µg/ml.

Generation of stable cell lines

For the production of rescue cell lines, MCF7, and hCAF1^{kd} cell lines were transfected with 5 µg of vectors expressing Flag-mCAF1 (pCiflag-mCAF1) or with empty pCiflag (2 × 10⁶ cells in a 100-mm culture dish) using Exgen 500 (Euromedex). Selection was initiated 48 h after transfection in medium containing 750 µg/ml of G418. MCF7pCI and MCF7mCAF1 cell populations were maintained in medium containing 300 µg/ml of G418; mock-mCAF1, mock-pCI, hCAF1^{kd}-mCAF1 and hCAF1^{kd}-pCI were maintained in medium containing 300 µg/ml of G418 and 5 µg/ml of blasticidin.

Microarray analysis

Total RNA from biological triplicates of hCAF1^{kd} and mock cells was isolated, processed and hybridized using Affymetrix HuEx arrays. HuEx arrays contain probes targeting > 1 million exons from well-annotated or computationally predicted genes. In this study, we focused on genes with known cDNAs. For each gene, the average intensity of exonic probes was calculated in each sample from four independent experiments. Human Exon 1.0 ST Array data set

analysis and visualization were made using EASANA (GenoSplice Technology, www.genosplice.com) based on GenoSplice's FAST DB annotations, as described in detail in Supplementary data.

Immunoprecipitation, western blot and antibodies

We carried out immunoprecipitations and western blots as described (Robin-Lespinnas *et al.*, 2007) except that cell lysates were treated or not with 0.5 mg/ml of RNase A for 10 min at room temperature before incubation with either normal rabbit IgG, the affinity purified rabbit polyclonal antibodies against hCAF1 or hCCR4 previously described (Morel *et al.*, 2003). Rabbit polyclonal antibodies against CNOT1 protein were produced by Agrobio Laboratory (France) using specific peptide (KPGNLLKDKDLKLNLDLC). For IF analysis, the mouse polyclonal anti-hCAF1 (AO1) from Abnova was used. The rabbit polyclonal anti-STAT1z9p1 (C-24), the goat polyclonal anti-IFITM1 (P-17) and the mouse monoclonal anti-PML (PG-M3) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Anti-phospho Tyr701 STAT1 (#9171S) rabbit polyclonal antibody was purchased from Cell Signaling Technology, the anti-GAPDH (clone 6C5) was from Biodesign International and the anti-acetyl-Histone H4 (06-598) from Millipore. The polyclonal rabbit anti-DCP1 antibody was kindly provided by J. Lykke-Anderson (Department of Molecular and Developmental Biology, University of Colorado, USA).

siRNA and plasmid transfection

One million cells were plated in a 10-mm culture dish and transfected with a final concentration of 50 nM of each siRNA duplex using lipofectamin 2000 (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. The siRNA sequences targeting hCAF1 corresponded to the coding regions 697–715 (sihCAF1 n°2) and 463–480 (sihCAF1 n°4) and the siRNA sequence targeting STAT1 corresponded to the coding region 647–669.

Real-time PCR

In all, 1 µg of total RNA purified using TRI-Reagent (Sigma) was reverse transcribed using 100 ng of random primers following the Superscript II (Invitrogen) protocol. Real-time PCR was performed with SYBR Green qPCR master mix (Applied Biosystems) in a Step One plus real-time PCR detection system (Applied Biosystems). All

hCAF1 regulates STAT1 activation

C Chapat *et al*

amplifications were performed in duplicate. Mean values of duplicate measurements were calculated according to the $-\Delta\Delta C_t$ quantification method using 36B4 gene expression as a reference for normalization. Relative mRNA levels in control cells were equated to 1 and other values were expressed relative to this. Each PCR run also included non-template controls containing all reagents except cDNA which generated no amplification. Specificity was confirmed by analysing the melting curves of PCR products. RT-qPCR results were repeated at least three times in independent experiments and expressed as mean values; *P*-value was determined by Student's *t*-test. Sequences of the oligonucleotides used are listed in Supplementary data.

GST-pull down

GST fusions of hCAF1 and hCCR4 were expressed in *Escherichia coli* and purified over glutathione sepharose beads. Binding assays were carried out as previously described (Prevot *et al*, 2001).

Luciferase reporter assay

Cells, plated in 24-well plates 24 h before transfection, were transfected with 50 ng of reporter plasmid and 25 ng of pRL-TK Renilla luciferase vector (Promega, Madison, WI) used as an internal control using ExGen 500 (Euromedex) as described (Morel *et al*, 2003). The luciferase activity was determined by a dual luciferase assay kit (Promega) with a Luminoskan Ascent luminometer (Thermo Scientific, Waltham, MA).

Assessment of apoptosis

For annexin V binding, cells (200 000) were harvested by trypsin treatment. After inactivation of trypsin by addition of the supernatant, the cells were washed and resuspended in annexin V binding buffer, incubated with propidium iodide and FITC-labelled annexin V (AbCys; according to manufacturer's instructions), and then analysed by flow cytometry using a FACS Canto II flow cytometer (Becton Dickinson).

Proliferation assay

Cells (1.5×10^3) were seeded in triplicate in 96-well plates. One plate was prepared each day during the time course. At each time point, cells were treated with Uptiblu (Interchim) and incubated for 3 h at 37°C. Fluorescence intensity was monitored at 530–560 nm excitation wave length and 590 nm emission wavelength (CytoFluor, PerSeptive Biosystem).

Immunofluorescence

Cells (10×10^4) were grown on coverslips in 12-well plates. For IFN treatment, cells were incubated for 1 h in fresh medium containing 5 ng/ml of IFN γ , and then treated as previously described (Robin-Lesp  nasse *et al*, 2007) and analysed with a Confocal SP5 Leica microscope.

Proximity ligation assay

PLA was performed using the Duolink kit (Eurogentech) according to manufacturer's instructions. Cells (2×10^5) were fixed in ice-cold methanol for 5 min, washed twice in PBS and incubated with primary antibodies for 1 h at 37°C in a pre-heated humidity chamber. After two washes in PBS-Tween 0.1%, cells were incubated with the appropriate PLA probes for 1 h at 37°C then washed in PBS-T, and the ligation solution was added on the coverslips and incubated for 30 min at 37°C. Finally, the amplification solution containing a DNA polymerase was added and incubated with the cells for 100 min at 37°C. After a final wash, the cells were mounted on glass slides in a mounting solution of Dapi, and imaging was performed on a fluorescence microscope.

Viral infection

In all, 2×10^5 cells were infected by SeV at a final concentration of 20 HAU/ml in complete DMEM. After 2 h, the inoculum was removed and replaced with fresh medium. At different times post infection, cells were lysed in TRI-Reagent (Sigma) for total RNA extraction. SeV genome has been detected and quantified by RT-qPCR using the following primers: 5'-GCCGGTCCACGAATCTAG G-3' and 5'-CCCAATCAGCGGCCGAAGAA-3'. Mean values of duplicate measurements were calculated according to the $-\Delta\Delta C_t$ quantification method using 36B4 gene expression as a reference for normalization. Cell viability was measured at 0, 48 and 96 h post infection by Uptiblu (Interchim). Fluorescence intensity was mon-

itored at 530–560 nm excitation wave length and 590 nm emission wavelength (CytoFluor, PerSeptive Biosystem).

Chromatin immunoprecipitation

Cells treated or not with 5 ng/ml of IFN γ for 1 h were cross-linked with 1% formaldehyde at room temperature for 10 min, then treated with 0.125 M glycine for 5 min, and washed with ice-cold PBS. ChIP assays were carried out using the kit from Upstate Biotechnology. Briefly, chromatin was shared by sonication in a Diagenode Bioruptor (10 pulses \times 30''). ChIP assays were performed with anti-STAT1 α p91 (sc-345), with the anti-acetyl-Histone H4 (06-598) or rabbit IgG as a negative control. The antibody–chromatin reactions were precipitated with salmon sperm DNA/protein A agarose beads for 3 h by rotation. Unbound chromatin was removed according to manufacturer's instructions. Samples were extracted twice with 250 μ l of elution buffer and heated at 65°C overnight to reverse cross-links. After DNA purification, qPCRs were performed in triplicate in a 96-well optical reaction plate using SYBR Green PCR Master Mix (Life Technology). The $-\Delta\Delta C_t$ values for each locus were calculated with respect to the ChIP input DNA, normalized to a reference locus (3' downstream region of the GAPDH gene). The sequences of primers used to amplify ChIP-enriched DNA are listed in Supplementary data.

Restriction enzyme hypersensitivity assay

Restriction enzyme hypersensitivity experiments were adapted from Ni *et al*, (2005). Briefly, cells were washed with ice-cold PBS and nuclei were isolated with lysis buffer (10 mM Tris pH 7.4, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 5 mM MgCl $_2$, 0.1 mM EGTA, 0.1% NP-40, 0.3 M sucrose). 2×10^6 nuclei were suspended in 200 μ l of digestion buffer (10 mM Tris pH 7.9, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl $_2$, 0.3 M sucrose, 1 mM DTT), and incubated with 2 U or 20 U of PstI (Fermentas) at 37°C for 30 min. The reaction was stopped by adding two volumes of nuclear lysis buffer (0.3 M CH $_3$ COONa, 5 mM EDTA, 0.5% SDS, and 0.1 mg of proteinase K/ml) and overnight incubation at 55°C. DNA was extracted with phenol-chloroform, precipitated with ethanol, and resuspended in water. The undigested DNA was measured by quantitative real-time PCR with primers flanking the PstI site. PCR in the last exon of *IFI27* gene with primers that did not flank any PstI restriction site was carried out to correct for equal loading of the samples.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm s.d. or mean \pm s.e.m. Statistical analyses were carried out with Student's *t*-tests. Differences were considered statistically significant at *P* < 0.05.

Accession codes

Human Exon 1.0 ST Array data are available in the Gene Expression Omnibus repository under accession number GSE43334.

Supplementary data

Supplementary data are available at *The EMBO Journal* Online (<http://www.embojournal.org>).

Acknowledgements

We are grateful to Alain Puisieux for his precious support. We thank Cécile Languillaire, Sarah Benoit and Amandine Mosnier for helpful technical assistance, J Lykke-Andersen for giving the anti-DCP1a antibody and 'Angloscribe' for reading the manuscript. This study was partially supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe labellis  e 2009), the 'Association pour la Recherche sur le Cancer' (ARC) and Région Rhône-Alpes ARC1-Santé 2012. CC is supported by a fellowship from the French Ministry of Research and ARC and CK by the Ligue Nationale Contre le Cancer and by the Comit   de la Loire.

Author contributions: LC, SS, CC and CK conceived the study, designed the experiments and analysed data. CC and CK carried out most of the experiments, except that DA performed the microarray experiments and with PDLG conducted bioinformatics' analysis of microarray data. MLR and KC contributed in result discussions and provided material. LC coordinated the project. The manuscript was written by LC, with contributions from CC, CK and SS.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Aslam A, Mittal S, Koch F, Andrau JC, Winkler GS (2009) The Ccr4-NOT deadenylase subunits CNOT7 and CNOT8 have overlapping roles and modulate cell proliferation. *Mol Biol Cell* **20**: 3840–3850
- Bartlam M, Yamamoto T (2010) The structural basis for deadenylation by the CCR4-NOT complex. *Protein Cell* **1**: 443–452
- Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E (2006) mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev* **20**: 1885–1898
- Berthet C, Morera AM, Asensio MJ, Chauvin MA, Morel AP, Dijoud F, Magaud JP, Durand P, Rouault JP (2004) CCR4-associated factor CAF1 is an essential factor for spermatogenesis. *Mol Cell Biol* **24**: 5808–5820
- Bianchin C, Mauxion F, Sentis S, Seraphin B, Corbo L (2005) Conservation of the deadenylase activity of proteins of the Caf1 family in human. *RNA* **11**: 487–494
- Bogdan JA, Adams-Burton C, Pedicord DL, Sukovich DA, Benfield PA, Corjay MH, Stoltenberg JK, Dicker IB (1998) Human carbon catabolite repressor protein (CCR4)-associative factor 1: cloning, expression and characterization of its interaction with the B-cell translocation protein BTG1. *Biochem J* **336**(Pt 2): 471–481
- Bregman A, Avraham-Kelbert M, Barkai O, Duek L, Guterman A, Choder M (2011) Promoter elements regulate cytoplasmic mRNA decay. *Cell* **147**: 1473–1483
- Bromberg J, Darnell Jr JE (2000) The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* **19**: 2468–2473
- Chatterjee-Kishore M, Wright KL, Ting JP, Stark GR (2000) How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *EMBO J* **19**: 4111–4122
- Cheon H, Stark GR (2009) Unphosphorylated STAT1 prolongs the expression of interferon-induced immune regulatory genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 9373–9378
- Christova R, Jones T, Wu PJ, Bolzer A, Costa-Pereira AP, Watling D, Kerr IM, Sheer D (2007) P-STAT1 mediates higher-order chromatin remodelling of the human MHC in response to IFN γ . *J Cell Sci* **120**: 3262–3270
- Collart MA, Panasencko OO (2012) The Ccr4-NOT complex. *Gene* **492**: 42–53
- Collart MA, Timmers HT (2004) The eukaryotic Ccr4-not complex: a regulatory platform integrating mRNA metabolism with cellular signaling pathways? *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **77**: 289–322
- Denis CL, Chen J (2003) The CCR4-NOT complex plays diverse roles in mRNA metabolism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **73**: 221–250
- Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD (2006) Interferons, immunity and cancer immunomodulation. *Nat Rev Immunol* **6**: 836–848
- Eulalio A, Behm-Ansmant I, Izaurralde E (2007) P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 9–22
- Eulalio A, Huntzinger E, Nishihara T, Rehwinkel J, Fauser M, Izaurralde E (2009) Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA* **15**: 21–32
- Everett RD, Chelbi-Alix MK (2007) PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. *Biochimie* **89**: 819–830
- Ezzeddine N, Chang TC, Zhu W, Yamashita A, Chen CY, Zhong Z, Yamashita Y, Zheng D, Shyu AB (2007) Human TOB, an anti-proliferative transcription factor, is a poly(A)-binding protein-dependent positive regulator of cytoplasmic mRNA deadenylation. *Mol Cell Biol* **27**: 7791–7801
- Fabian MR, Mathonnet G, Sundermeier T, Mathys H, Zipprich JT, Svitkin YV, Rivas F, Jinek M, Wohlschlegel J, Doudna JA, Chen CY, Shyu AB, Yates III JR, Hannon GJ, Filipowicz W, Duchaine TF, Sonenberg N (2009) Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation. *Mol Cell* **35**: 868–880
- Garapaty S, Mahajan MA, Samuels HH (2008) Components of the CCR4-NOT complex function as nuclear hormone receptor coactivators via association with the NRC-interacting factor NIF-1. *J Biol Chem* **283**: 6806–6816
- Gialitakis M, Arampatzis P, Makatounakis T, Papamatheakis J (2010) Gamma interferon-dependent transcriptional memory via relocalization of a gene locus to PML nuclear bodies. *Mol Cell Biol* **30**: 2046–2056
- Hata H, Mitsui H, Liu H, Bai Y, Denis CL, Shimizu Y, Sakai A (1998) Dhh1p, a putative RNA helicase, associates with the general transcription factors Pop2p and Ccr4p from *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **148**: 571–579
- Ikematsu N, Yoshida Y, Kawamura-Tsuzuku J, Ohsugi M, Onda M, Hirai M, Fujimoto J, Yamamoto T (1999) Tob2, a novel anti-proliferative Tob/BTG1 family member, associates with a component of the CCR4 transcriptional regulatory complex capable of binding cyclin-dependent kinases. *Oncogene* **18**: 7432–7441
- Jakymiw A, Lian S, Eystathioy T, Li S, Satoh M, Hamel JC, Fritzler MJ, Chan EK (2005) Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nat Cell Biol* **7**: 1267–1274
- Khodarev NN, Roizman B, Weichselbaum RR (2012) Molecular pathways: interferon/stat1 pathway: role in the tumor resistance to genotoxic stress and aggressive growth. *Clin Cancer Res* **18**: 3015–3021
- Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**: 693–705
- Levy DE, Darnell Jr JE (2002) Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 651–662
- Liang W, Li C, Liu F, Jiang H, Li S, Sun J, Wu X, Li C (2009) The Arabidopsis homologs of CCR4-associated factor 1 show mRNA deadenylation activity and play a role in plant defence responses. *Cell Res* **19**: 307–316
- Mauxion F, Faux C, Seraphin B (2008) The BTG2 protein is a general activator of mRNA deadenylation. *EMBO J* **27**: 1039–1048
- Miller JE, Reese JC (2012) Ccr4-Not complex: the control freak of eukaryotic cells. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **47**: 315–333
- Molin L, Puisieux A (2005) C. elegans homologue of the Caf1 gene, which encodes a subunit of the CCR4-NOT complex, is essential for embryonic and larval development and for meiotic progression. *Gene* **358**: 73–81
- Morel AP, Sentis S, Bianchin C, Le Romancer M, Jonard L, Rostan MC, Rimokh R, Corbo L (2003) BTG2 antiproliferative protein interacts with the human CCR4 complex existing in vivo in three cell-cycle-regulated forms. *J Cell Sci* **116**: 2929–2936
- Nakamura T, Yao R, Ogawa T, Suzuki T, Ito C, Tsunekawa N, Inoue K, Ajima R, Miyasaka T, Yoshida Y, Ogura A, Tashimori K, Noce T, Yamamoto T, Noda T (2004) Oligo-astheno-teratozoospermia in mice lacking Cnot7, a regulator of retinoid X receptor beta. *Nat Genet* **36**: 528–533
- Ni Z, Karaskov E, Yu T, Callaghan SM, Der S, Park DS, Xu Z, Pattenden SG, Bremner R (2005) Apical role for BRG1 in cytokine-induced promoter assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 14611–14616
- Panasencko OO, Collart MA (2011) Not4 E3 ligase contributes to proteasome assembly and functional integrity in part through Ecm29. *Mol Cell Biol* **31**: 1610–1623
- Parker R, Sheth U (2007) P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell* **25**: 635–646
- Pillai RS (2005) MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA* **11**: 1753–1761
- Prevot D, Morel AP, Voeltzel T, Rostan MC, Rimokh R, Magaud JP, Corbo L (2001) Relationships of the antiproliferative proteins BTG1 and BTG2 with CAF1, the human homolog of a component of the yeast CCR4 transcriptional complex: involvement in estrogen receptor alpha signaling pathway. *J Biol Chem* **276**: 9640–9648
- Ramana CV, Chatterjee-Kishore M, Nguyen H, Stark GR (2000) Complex roles of Stat1 in regulating gene expression. *Oncogene* **19**: 2619–2627
- Ramana CV, Gil MP, Schreiber RD, Stark GR (2002) Stat1-dependent and -independent pathways in IFN- γ -dependent signaling. *Trends Immunol* **23**: 96–101
- Robin-Lespinasse Y, Sentis S, Kolytcheff C, Rostan MC, Corbo L, Le Romancer M (2007) hCAF1, a new regulator of PRMT1-dependent arginine methylation. *J Cell Sci* **120**: 638–647
- Rouault JP, Prevot D, Berthet C, Biollaud M, Magaud JP, Corbo L (1998) Interaction of BTG1 and p53-regulated BTG2 gene products with mCAF1, the murine homolog of a component of the yeast CCR4 transcriptional regulatory complex. *J Biol Chem* **273**: 22563–22569
- Schwede A, Manful T, Jha BA, Helbig C, Bercovich N, Stewart M, Clayton C (2009) The role of deadenylation in the degradation of

hCAF1 regulates STAT1 activation
C Chapat *et al*

- unstable mRNAs in trypanosomes. *Nucleic Acids Res* **37**: 5511–5528
- Shalem O, Dahan O, Levo M, Martinez MR, Furman I, Segal E, Pilpel Y (2008) Transient transcriptional responses to stress are generated by opposing effects of mRNA production and degradation. *Mol Syst Biol* **4**: 223
- Shalem O, Groisman B, Choder M, Dahan O, Pilpel Y (2011) Transcriptome kinetics is governed by a genome-wide coupling of mRNA production and degradation: a role for RNA Pol II. *PLoS Genet* **7**: e1002273
- Shi S, Larson K, Guo D, Lim SJ, Dutta P, Yan SJ, Li WX (2008) Drosophila STAT is required for directly maintaining HP1 localization and heterochromatin stability. *Nat Cell Biol* **10**: 489–496
- Sproul D, Gilbert N, Bickmore WA (2005) The role of chromatin structure in regulating the expression of clustered genes. *Nat Rev Genet* **6**: 775–781
- Tucker M, Valencia-Sanchez MA, Staples RR, Chen J, Denis CL, Parker R (2001) The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **104**: 377–386
- Weichselbaum RR, Ishwaran H, Yoon T, Nuyten DS, Baker SW, Khodarev N, Su AW, Shaikh AY, Roach P, Kreike B, Roizman B, Bergh J, Pawitan Y, van de Vijver MJ, Minn AJ (2008) An interferon-related gene signature for DNA damage resistance is a predictive marker for chemotherapy and radiation for breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 18490–18495
- Yan SJ, Lim SJ, Shi S, Dutta P, Li WX (2011) Unphosphorylated STAT and heterochromatin protect genome stability. *FASEB J* **25**: 232–241
- Yang J, Stark GR (2008) Roles of unphosphorylated STATs in signaling. *Cell Res* **18**: 443–451
- Zaret KS, Carroll JS (2011) Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. *Genes Dev* **25**: 2227–2241
- Zheng D, Ezzeddine N, Chen CY, Zhu W, He X, Shyu AB (2008) Deadenylation is prerequisite for P-body formation and mRNA decay in mammalian cells. *J Cell Biol* **182**: 89–101

Supplementary Information

hCAF1/CNOT7 regulates interferon signaling by targeting STAT1

Clément Chapat*, Chloé Kolytcheff*, Muriel Le Romancer, Didier Auboeuf, Pierre De La Grange, Kamel Chettab, Stéphanie Sentis, and Laura Corbo

Supplementary Information on Materials and Methods

Microarray analysis

Total RNA from biological triplicates of hCAF1^{kd} and mock cells was isolated, processed and hybridized using Affymetrix HuEx arrays. HuEx arrays contain probes targeting >1 million exons from well-annotated or computationally predicted genes. In this study, we focused on genes with known cDNAs. For each gene, the average intensity of exonic probes was calculated in each sample from four independent experiments. Human Exon 1.0 ST Array dataset analysis and visualization were made using EASANA® (GenoSplice technology, www.genosplice.com) based on GenoSplice's FAST DB® annotations.

Pre-treatment data

Exon Array data were normalized using quantile normalization. Background correction was made using the antigenomic probes and probe selection was made as described previously¹. Only probes targeting annotated exons from FAST DB® transcripts were selected in order to focus on well-annotated genes whose mRNA sequences are available in public databases^{2, 3}. Poor-quality probes (*e.g.*, probes classified as “cross-hybridizing” by Affymetrix) and probes with too low signal intensity compared to antigenomic background probes with the same GC content were removed from the analysis. Only probes with a DABG p value ≤ 0.05 in at least half of the arrays were considered for statistical analysis.¹

Selection of regulated genes

Only genes expressed in at least one compared condition were analyzed. Genes were considered expressed if the Log₂ gene signal intensity was ≥ 6.0 and the DABG p value ≤ 0.05 for at least half of the gene probes. We performed a paired Student's *t*-test to compare gene intensities in the different biological replicates. Genes were considered significantly regulated when fold-change was ≥ 1.5 and p-value ≤ 0.05 .

Hierarchical Clustering

The distance between the gene signal in a given sample and the corresponding average signal in the 6 samples was calculated for each regulated gene. Corresponding values were displayed and clustered with Me V4.6.2 software from The Institute of Genome Research using Euclidean distance and complete linkage clustering.

Supplementary References

- 1 de la Grange P, Gratadou L, Delord M, Dutertre M, Auboeuf D (2010) Splicing factor and exon profiling across human tissues. *Nucleic Acids Res* **38**:2825-2838
- 2 de la Grange P, Dutertre M, Martin N, Auboeuf D (2005) FAST DB: a website resource for the study of the expression regulation of human gene products. *Nucleic Acids Res* **33**:4276-4284
3. de la Grange P, Dutertre M, Correa M, Auboeuf D (2007) A new advance in alternative splicing databases: from catalogue to detailed analysis of regulation of expression and function of human alternative splicing variants. *BMC Bioinformatics* **8**:180

Sequences of the synthetic oligonucleotides used for real-Time PCR:


Gene	Forward	Reverse
IFI27	5' ACGGAATTAACCCGAGCAG 3'	5' GCCACAACCTCTCCAATCAC 3'
IFITM1	5' ATGTCGTCTGGTCCCTGTTC 3'	5' CAGGATGAATCCAATGGTCA 3'
IRF9	5' CAAGGCCTGGGCAATATTTA 3'	5' ACTGTGCTGTGCTTTTGATG 3'
STAT1	5' CACGCACACAAAAGTGATGA 3'	5'AGAGGTCGTCTCGAGGTCAA 3'
PLSCR1	5' GGTTTACTTTGCAGCGGAAG 3'	5' TGGTACACCAGGAGGAGCTT 3'
CAF1	5'TGAAGAGATGAAGAAAATTCGTCAAG 3'	5' CTTGCAACCACACCTGGAAAC 3'
SULF1	5' CAGACAGCCTGTGAACAACC 3'	5' GCCGTTGACTCTTTCTTTGG 3'

HERC6	5' GTTCCTGCATGTGGTTTCCT 3'	5' CTTGCAAACCTCTCCCCAAC 3'
IFI6	5' CTCGGAGAGCTCGGACAG 3'	5' CATTCAAGGATCGCAGACCAG 3'
CSTA	5' TTTGGTTCCAGCATCCTGTC 3'	5' TGCACAGCTTCCAATTTTCC 3'
SOCS1	5' GGAAGGAGCTCAGGTAGTC 3'	5' AGCTTCGACTGCCTCTT 3'
IRF1	5' AAAAGGAGCCAGATCCCAAGA 3'	5' CATCCGGTACACTCGCACAG 3'
TAP1	5' AGGTACTGCTCTCCATCTAC 3'	5' AGTGTAAGGGAGTCAACAGA 3'
36B4	5' GTGTTTCGACAATGGCAGCAT 3'	5' GACACCCTCCAGGAAGCGA 3'

Sequences of the synthetic oligonucleotides used for ChIP and REHA analyses:

Region	Forward	Reverse
Gapdh 3' region	5' ATGGTTGCCACTGGGGATCT 3'	5' TGCCAAAGCCTAGGGGAAGA 3'
Ifi27 promoter	5' TCTTCTGGACTGCGCATGAG 3'	5' GAAGCACTGCCCCTTGACAC 3'
Ifi27 last exon	5' TCTCCGGATTGACCAAGTTCA 3'	5' CAGGGAGCTAGTAGAACCTCGC 3'
Ifitm1 promoter	5' TTAGCCTTCAGCCTTTCCTCC 3'	5' TAGCCAGGGACCAATGAGGT 3'
Stat1 promoter	5' CGCCAGGGAGAAACCGTTGGG 3'	5' GGCTTTGCGCGGTGCAGTTT 3'

Supplementary Tables

Supplementary Table 1. DNA array analysis of hCAF1^{kd} cells versus mock cells.


Gene symbol	Intensity CTRL	Intensity siCAF1	Regulation	Fold-Change	P-value
IFI27	6,37	10,85	up	22,34	5,60E-03
BST2	5,55	8,74	up	9,13	6,00E-04
OAS2	5,44	8,23	up	6,90	6,06E-03
IFI6	9,25	11,89	up	6,26	1,74E-03
IFITM1	7,85	10,25	up	5,25	4,16E-03
IFI44L	4,82	7,01	up	4,55	1,15E-02
ISG15	7,75	9,82	up	4,20	1,39E-02
LGALS3BP	8,74	10,51	up	3,41	2,44E-03
HERC6	6,14	7,88	up	3,33	2,80E-02
OAS1	7,69	9,22	up	2,88	2,57E-02
OAS3	7,69	9,20	up	2,85	7,80E-03
STAT1	8,67	10,03	up	2,57	2,38E-02
IFI35	7,83	9,19	up	2,56	4,07E-02
CMPK2	5,76	7,10	up	2,53	3,25E-02
PSMB8	6,35	7,59	up	2,36	3,91E-02
IFITM3	10,33	11,56	up	2,34	7,02E-03
PSMB9	7,43	8,55	up	2,18	3,95E-02
UBE2L6	9,05	10,17	up	2,18	1,25E-02
PARP12	7,98	8,93	up	1,94	2,28E-02
CLDN1	6,74	7,68	up	1,92	1,65E-02
AKR1C3	8,56	9,49	up	1,91	6,94E-03
IFITM2	10,38	11,30	up	1,89	4,62E-02
USP18	8,13	9,03	up	1,86	1,77E-02
IFIT5	5,98	6,87	up	1,85	3,83E-02
PLSCR1	7,07	7,96	up	1,85	4,62E-03
RDX	7,34	8,22	up	1,84	1,17E-02
HLA-C	9,67	10,52	up	1,80	7,64E-03
DTX3L	7,70	8,51	up	1,75	2,93E-02
SLC7A11	6,87	7,67	up	1,74	3,99E-02
HLA-F	10,12	10,90	up	1,71	4,75E-02
HLA-B	9,33	10,09	up	1,69	1,33E-02
SP110	6,67	7,41	up	1,67	2,76E-02
CNN2	8,39	9,09	up	1,63	2,80E-02
TAP1	8,11	8,80	up	1,62	3,69E-02
IGFBP3	8,49	9,12	up	1,55	2,45E-02
PPM1K	6,91	7,52	up	1,53	6,00E-04
CNOT7	8,56	6,80	down	3,38	2,01E-03
SLC14A1	8,20	7,55	down	1,57	4,58E-02

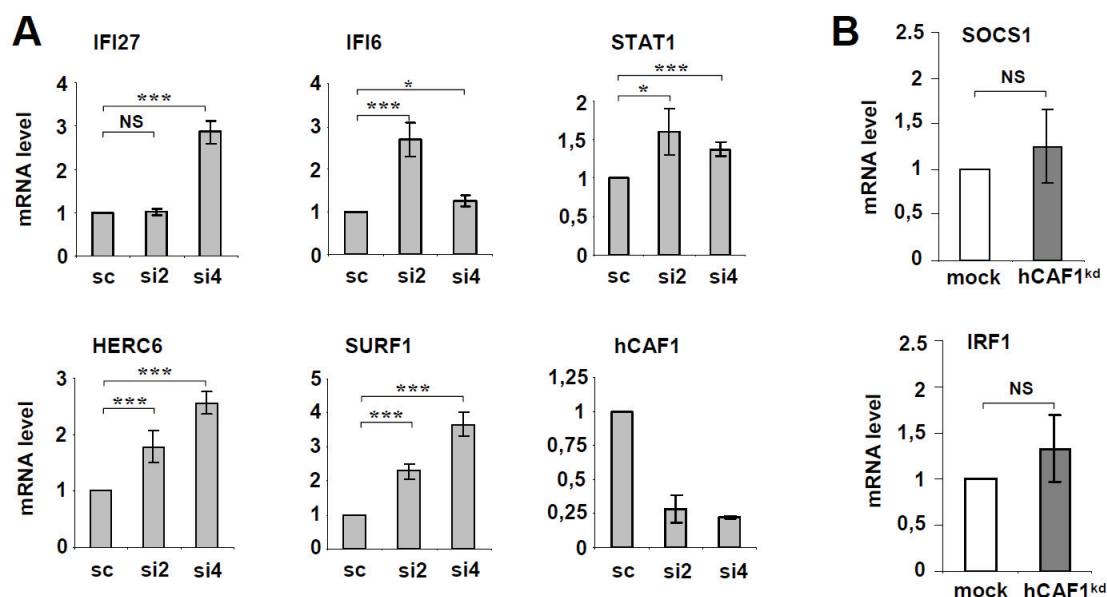
S100A16	10,20	9,57	down	1,55	1,93E-02
CEACAM6	7,89	7,34	down	1,47	2,83E-02
MGST2	7,81	7,29	down	1,44	2,21E-02
BMPR1B	7,52	7,01	down	1,43	2,21E-02
CCNE1	8,24	7,74	down	1,41	4,26E-02
CKMT1A	9,49	8,99	down	1,41	4,82E-04

Supplementary Table 2 . Functional analysis of putative hCAF1 target genes using PANTHER (www.pantherdb.org)

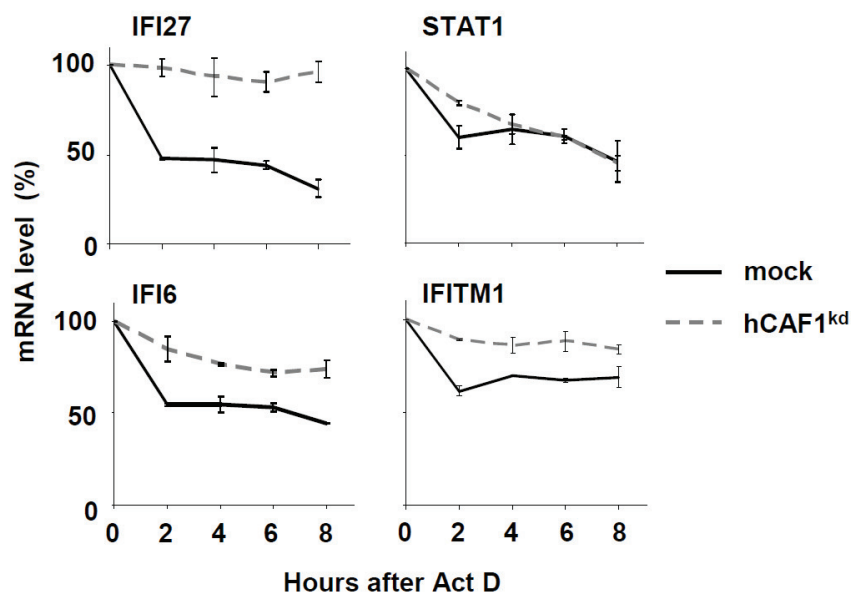
FUNCTIONNAL ANALYSIS USING PANTHER (www.pantherdb.org)				
Biological Process	Nb genes in the Reference list	Nb regulated genes	Expected nb genes	P-value
Immunity and defense	1318	12	1,40	3,13E-09
Interferon-mediated immunity	63	5	0,07	7,20E-09
Other transport	61	2	0,06	1,94E-03
Cholesterol metabolism	68	2	0,07	2,40E-03
Extracellular transport and import	89	2	0,09	4,06E-03
Transport	1306	5	1,39	1,12E-02
Steroid metabolism	183	2	0,19	1,61E-02
T-cell mediated immunity	194	2	0,21	1,80E-02
Other metabolism	559	3	0,59	2,10E-02
MHCI-mediated immunity	22	1	0,02	2,31E-02
Other intracellular signaling cascade	225	2	0,24	2,37E-02
Lipid, fatty acid and steroid metabolism	770	3	0,82	4,73E-02
Amino acid transport	47	1	0,05	4,87E-02
Molecular Function	Nb genes in the Reference list	Nb regulated genes	Expected nb genes	P-value
Nucleotidyltransferase	70	3	0,07	5,81E-05

Synthetase	96	3	0,10	1,47E-04
Defense/immunity protein	369	4	0,39	5,96E-04
ATP-binding cassette (ABC) transporter	46	2	0,05	1,11E-03
Synthase and synthetase	213	3	0,23	1,48E-03
Transporter	648	4	0,69	4,63E-03
Transfer/carrier protein	327	3	0,35	4,94E-03
Other transporter	334	3	0,35	5,23E-03
Nucleic acid binding	2850	7	3,03	2,60E-02
Amino acid transporter	31	1	0,03	3,24E-02
Tight junction	32	1	0,03	3,34E-02
Other cytoskeletal proteins	40	1	0,04	4,16E-02
Major histocompatibility complex antigen	46	1	0,05	4,77E-02

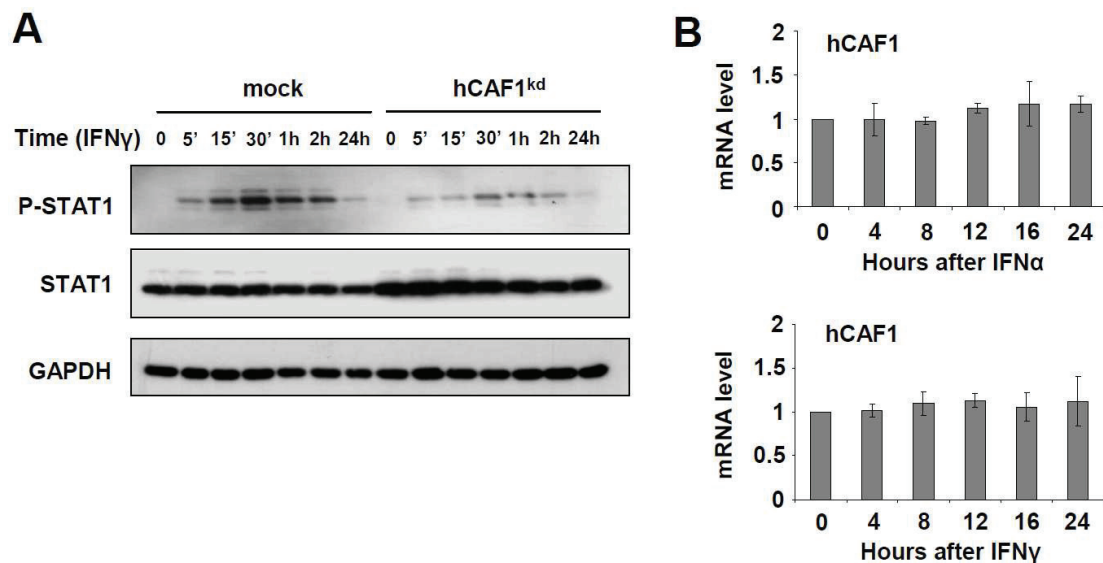
Supplementary Figures



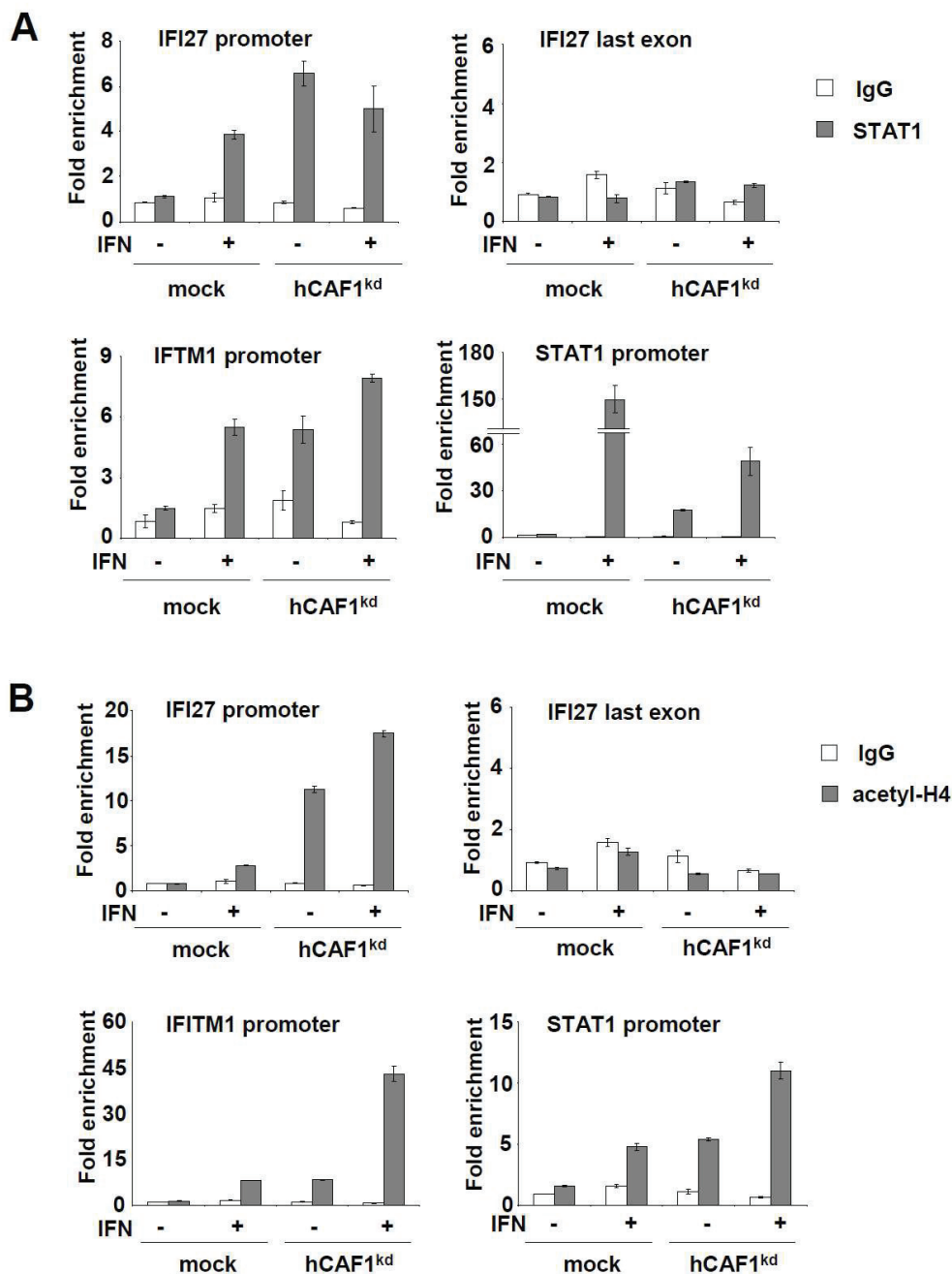
Supplementary Figure 1. (A) MCF7 cells were transfected with control siRNA (sc) or with two alternative siRNAs against hCAF1. 72h after transfection, the cells were harvested and total RNA extracts were prepared. SYBR green real-time RT-PCR analysis was performed with primers specific for the transcripts of the indicated genes. Gene expression levels were normalized to internal controls 36B4 and shown as expression levels relative to expression levels in (sc) control cells (arbitrarily set to 1). (B) Expression of two Interferon-inducible genes, SOCS1 and IRF1, in control MCF7 cells (mock) and hCAF1 knock-down cells (hCAF1^{kd}) was measured by SYBR green real-time RT-PCR analysis. mRNA levels were determined as previously described in (A). Error bars represent standard deviation of the mean of three independent experiments. *P*-values represent unpaired one-tailed *t*-test significance values. (*) $P < 0.05$; (***) $P < 0.005$; (NS) Non significant.



Supplementary Figure 2. Determination of the stability of hCAF1 regulated genes. (A) Mock and hCAF1^{kd} cells were treated with Actinomycin D and total mRNA was isolated at 0, 2, 4, 6 and 8 h after treatment. mRNA levels of the indicated genes were determined by SYBR green real-time RT-PCR. Results were plotted as a function of time from drug addition. Results are expressed as mean values of at least three independent experiments. Standard deviations are shown.

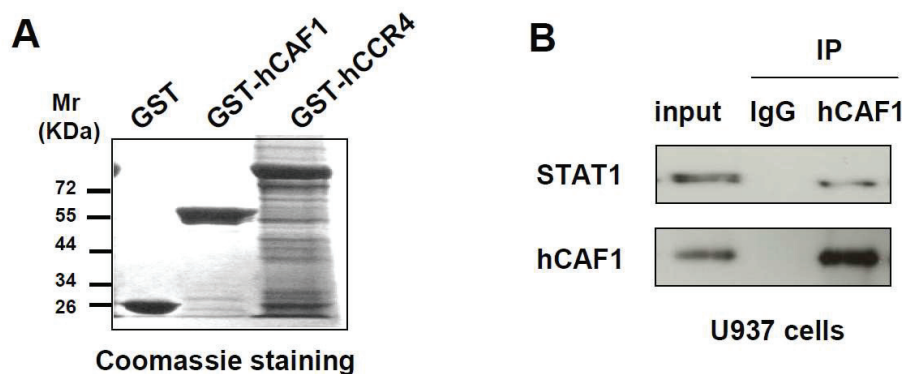


Supplementary Figure 3. (A) STAT1 activation in hCAF1 depleted cells. After IFN γ stimulation for the indicated times, the level of tyrosine 701 phosphorylation of STAT1 was measured in hCAF1^{kd} and control mock cells. Total protein extracts were prepared and analyzed by Western blot using the indicated antibodies. (B) Expression of hCAF1 gene upon interferon stimulation. Transcript level of hCAF1 was measured in MCF7 cells using RT-qPCR as described in Supplementary Figure 1 after IFN α (upper panel) or IFN γ (lower panel) stimulation for the indicated times. The experiments were performed in triplicate, expressed as mean values of three independent experiments. Standard deviations are shown.

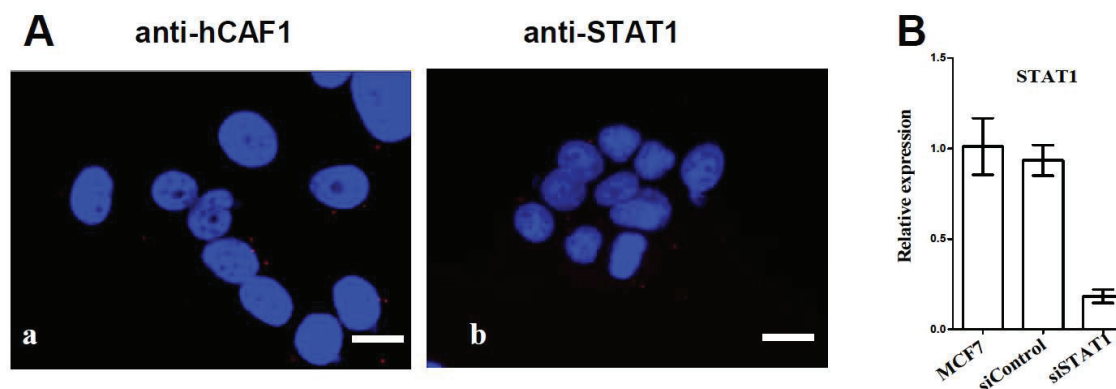


Supplementary Figure 4. Recruitment of STAT1 at a subset of STAT1 target promoters in hCAF1 knock-down cells treated or not with 5 ng/mL of Interferon γ for 1h. ChIP assays were performed using antibodies anti-STAT1 (A) and anti-acetyl H4 (B). Enriched DNA fragments were quantified by Q-PCR using specific primers for the indicated promoters with respect to the input DNA and normalized to a reference locus (3' downstream region of the *GAPDH* gene). Rabbit IgGs were used as a negative control. The illustrated experiments were

performed in triplicate, expressed as mean values and are representative of at least three independent experiments. Standard deviations are shown.



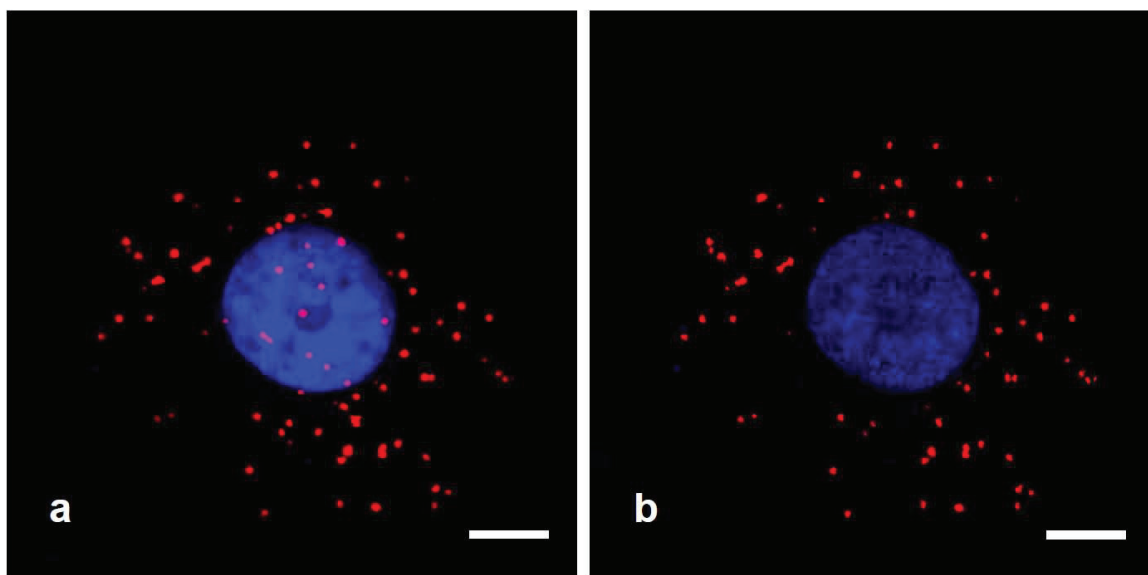
Supplementary Figure 5. (A) Coomassie blue staining of 5 μ g of GST alone, GST-hCAF1 and GST-hCCR4 used in GST pull-down analysis. (B) Interaction of endogenous hCAF1 and STAT1 in U937 cells. Extracts from U937 cells were immunoprecipitated (IP) with either normal rabbit IgG or anti-hCAF1 antibodies. Immunoprecipitates were then analyzed by immunoblotting with anti-STAT1 antibodies.



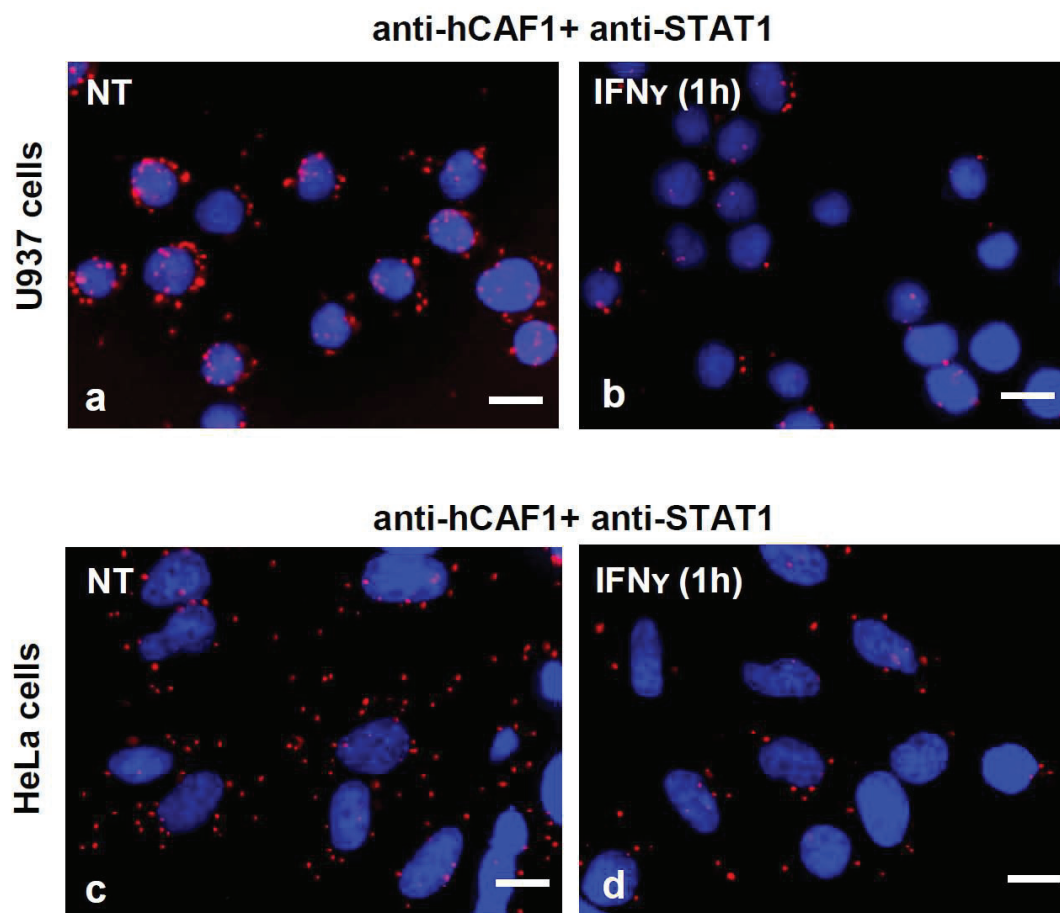
Supplementary Figure 6. (A) PLA control on untreated MCF7 cells using anti-hCAF1 (a) or anti-STAT1 (b) alone. MCF7 cells were grown on coverslips in 12-well plates. Proximity Ligation Assay (PLA) was performed using anti-hCAF1 or anti-STAT1 alone according to the manufacturer's instructions. Nuclei were counter-stained with DAPI (blue). View: $\times 63$. Scale bars = 20 μ m. (B) MCF7 cells were transfected with control siRNA (sc) or with siRNAs against STAT1. 72h after transfection, the cells were harvested and total RNA was prepared

to test STAT1 knockdown efficiency. SYBR green real-time RT-PCR analysis was performed for detection of transcript levels of STAT1. Results were normalized using 36B4 mRNA level as an internal control.

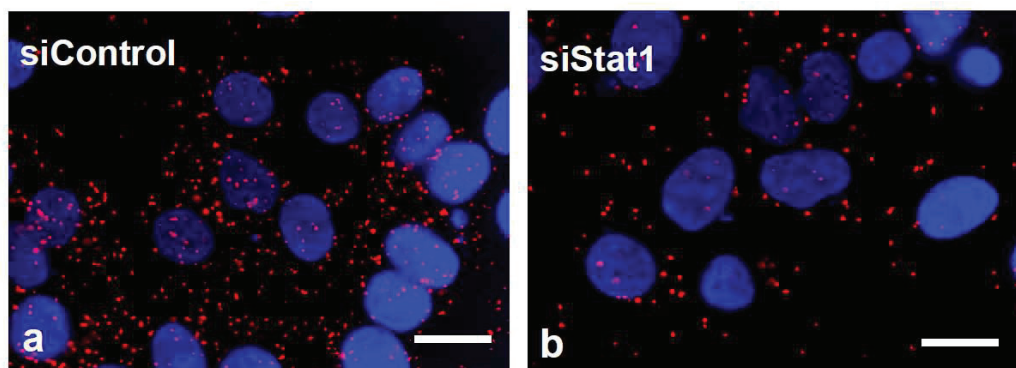
MCF7 cells - PLA: anti-hCAF1+ anti-STAT1



Supplementary Figure 7. Confocal microscopy after Proximity Ligation Assay (PLA) using anti-hCAF1 and anti-STAT1 on untreated MCF7 cells was used to localize the hCAF1/STAT1 interaction. (a) z-stack projection of 20 confocal sections from the basal to the apical cell side. (b) Single confocal section into the nucleus of the cell. Nuclei were counter-stained with DAPI (blue). View: $\times 63$. Scale bars = 10 μm .



Supplementary Figure 8. STAT1 and hCAF1 colocalize in the cytoplasm of the unstimulated cells. (a) U937 cells were cytopspined and (c) HeLa cells were grown on coverslips and then (b and d) treated with 5 ng/mL of Interferon γ for 1h. Proximity Ligation Assay (PLA) was used to detect the cellular co-localization of endogenous hCAF1 and STAT1 using anti-hCAF1 and anti-STAT1 on (a and c) untreated cells and (b and d) cells treated with 5 ng/mL of Interferon γ for 1h. Nuclei were counter-stained with DAPI (blue). View: $\times 63$. Scale bars = 20 μm .

MCF7 cells - PLA: anti-hNOT1+ anti-STAT1

Supplementary Figure 9. STAT1 and hNOT1 colocalize in the cytoplasm of the unstimulated cells. MCF7 cells were grown on coverslips and Proximity Ligation Assay (PLA) was used to detect the cellular co-localization of endogenous hNOT1 and STAT1. PLA was performed by using anti-hNOT1 and anti-STAT1 on MCF7 cells transfected with a) control siRNA or with b) siRNA against STAT1. Nuclei were counter-stained with DAPI (blue). View: $\times 63$. Scale bars = 20 μm .

II. Article 2 : Les isoformes hCAF1v1 et hCAFv2 utilisent des mécanismes distincts pour réguler l'expression des gènes

“hCAF1 isoforms utilize distinct mechanisms to regulate gene expression.”

Chapat C, Luong TT, Simonet P, Chettab K, and Corbo L

Manuscrit en cours de finalisation

A. Introduction à l'article 2

La seconde partie de mon travail de thèse a consisté à caractériser un autre aspect de la fonction de hCAF1 : l'existence d'un variant d'épissage de fonction inconnue. En effet, l'épissage alternatif du gène humain *Cnot7/Caf1* génère une seconde protéine isoforme plus courte de 41 acides aminés à son extrémité. La fonction de ce variant, nommé hCAF1v2 (variant 2) pour le distinguer de la forme plus longue hCAF1v1 (variant 1), n'a encore jamais été rapportée dans la littérature. Le gène humain *Cnot7/Caf1*, situé sur le chromosome 8, se compose de 8 exons et son épissage alternatif concerne particulièrement les exons 7 et 8 (figure 28A). hCAF1v2 est produit suite à l'inclusion complète de l'exon 7 et à l'exclusion de l'exon 8. L'isoforme hCAF1v1 est produit *via* l'utilisation d'un site d'épissage alternatif 5' dans l'exon 7 aboutissant à l'exclusion d'une partie de l'exon 7 et à l'inclusion de l'exon 8 (figure 28B). Il nous a donc semblé important de déterminer la fonction de cet isoforme en se focalisant principalement sur l'étude comparative des caractéristiques connues de la protéine hCAF1v1, c'est-à-dire son activité déadénylase, sa présence dans le complexe CCR4-NOT, son lien avec la famille BTG/TOB et sa capacité à réguler la méthylation des arginine dépendante de PRMT1. Nos résultats indiquent que la protéine hCAF1v2 présente une divergence

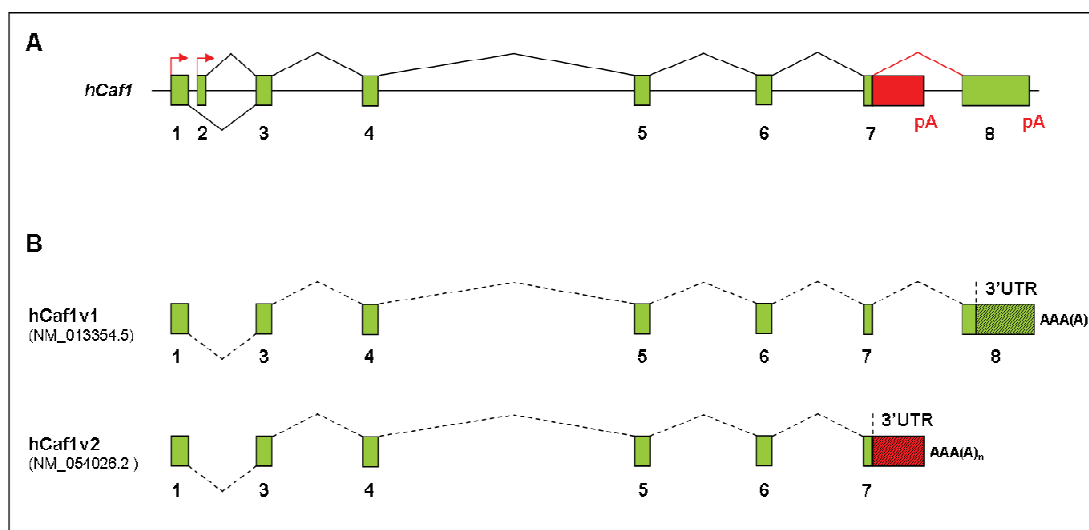


Figure 28 : Structure et épissage alternatif du gène humain *hCaf1*. A) Le gène *hCaf1* comprend 8 exons (verts) et fait l'objet d'un phénomène d'épissage alternatif au niveau des exons 7 et 8. L'annotation du gène met en évidence l'existence de deux sites d'initiation de la transcription potentiels et de deux signaux de polyadénylation (pA). B) Deux transcrits sont alternativement générés suite à l'épissage du gène *hCaf1*. L'isoforme hCaf1v1 est produit *via* l'utilisation d'un site d'épissage alternatif 5' dans l'exon 7 aboutissant à l'exclusion d'une partie de l'exon 7 et à l'inclusion de l'exon 8. A l'inverse, le variant hCAF1v2 présente une inclusion complète de l'exon 7 et une exclusion de l'exon 8. Les deux ARNm possèdent des régions 3'UTR uniques. (NM_: NCBI Reference Sequence)

fonctionnelle vis-à-vis de hCAF1v1 puisqu'elle ne possède pas d'activité déadénylase intrinsèque et s'avère davantage requise pour la régulation de la méthylation des arginines *via* son interaction avec l'enzyme PRMT1. Par ailleurs, nos résultats indiquent que hCAF1v2 n'interagit pas avec les membres de la famille BTG/TOB et présente une relative affinité pour le complexe CCR4-NOT. Les protéines hCAF1 semblent ainsi être capables de réguler l'expression des gènes *via* leur intégration dans différentes voies allant de la synthèse des ARNm jusqu'au contrôle de leur dégradation.

Afin de mieux comprendre l'implication de l'isoforme hCAF1v2 dans la régulation de la méthylation des arginines, le paragraphe suivant se focalise sur la présentation de l'arginine méthyl-transférase PRMT1 et son rôle dans la méthylation dans la cellule eucaryote.

B. Présentation de la protéine PRMT1

1) Description

La protéine PRMT1 (Protein aRginine Methyl Transferase 1) appartient à la famille des arginines méthyl-transférases PRMT conservée au cours de l'évolution. Chez les mammifères, la structure de PRMT1 possède une région conservée d'environ 310 acides aminés qui est impliquée dans la fixation du donneur de méthyl et dans la catalyse de la réaction enzymatique (Bedford and Clarke, 2009; Pal and Sif, 2007). Les autres acides aminés déterminant leur spécificité de substrats et la régulation de leur activité (figure 26).

La famille des PRMT peut être divisée en deux types selon si elles génèrent des diméthylarginines asymétriques, symétriques ou des monométhylations (figure 27). Chez l'homme, cette famille de protéines comprend 11 membres (PRMT1-11), dont 8 possèdent des spécificités de substrats différentes (Bedford and Richard, 2005; Nicholson et al., 2009). Seules, PRMT2, 10 et 11 n'ont pas encore montré d'activité méthyltransférase (Bedford and Clarke, 2009). L'enzyme PRMT1 est une méthyltransférase de type I qui transfère un groupement méthyl du S-Adénosyl Méthionine (AdoMet) vers un ou deux azotes du résidu arginine pour former une arginine monométhylée ou diméthylée asymétriquement (figure 27).

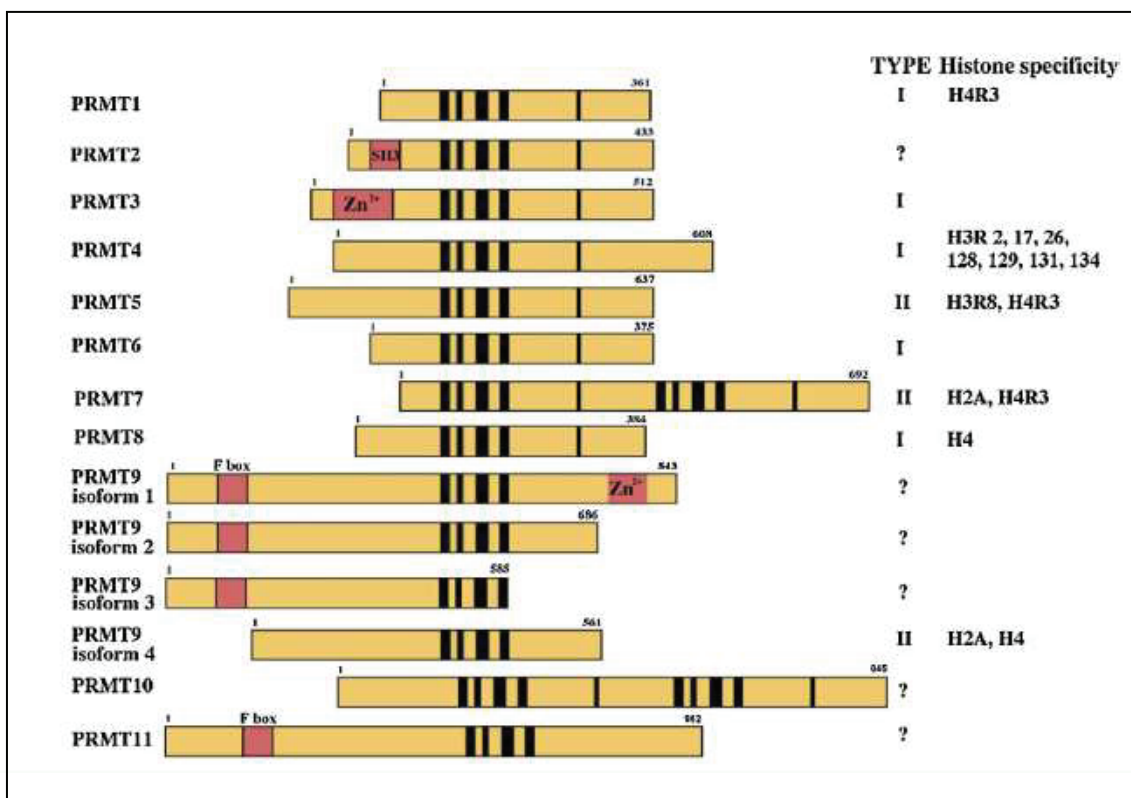


Figure 26 : Les arginines méthyltransférases de la famille des PRMT (D'après Pal et al; 2007).

PRMT1 est la méthyltransférase la plus abondante dans les cellules de mammifères et est responsable de plus de 85% des méthylations des arginines de la cellule. Elle est localisée à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme et est très mobile entre les deux compartiments (Côté et al., 2003; Herrmann et al., 2005; Pawlak et al., 2000; Tang et al., 2000). Sa localisation est régulée en partie par les protéines associées telle que PXP (pregnane X receptor) qui permet une accumulation de PRMT1 dans le noyau (Xie et al., 2009). Plusieurs facteurs ont été identifiés comme des régulateurs de l'activité de méthyltransférase de PRMT1, et notamment les membres de la famille BTG/TOB et la protéine CAF1 (Berthet et al., 2002; Robin-Lespinnasse et al., 2007).

PRMT1 possède de très nombreux substrats, la plupart possédant un site GAR (Glycine-Arginine-Rich), préférentiellement dans un contexte RG (Arginine-Glycine) ou RGG (Arginine-Glycine-Glycine). Ce type de motif qui est généralement retrouvé dans les protéines de liaison à l'ARN, suggérant un rôle important de la méthylation des arginines dans la modulation des interactions protéines-ARN ou protéines-protéines (Liu and Dreyfuss, 1995). Parmi les substrats de PRMT1, on trouve ainsi un grand nombre de hnRNPs, l'histone H4 sur l'arginine 3, des facteurs de transcription mais également des protéines impliquées

dans la signalisation cellulaire (Cha et al., 2011; Chang et al., 2011; Du et al., 2011; Guendel et al., 2010; Sakamaki et al., 2011; Strahl et al., 2001; Wang et al., 2001).

Le rôle central que joue PRMT1 dans la cellule est révélé par des expériences d'inactivation génétique chez la souris qui montrent que les embryons *Prmt1*^{-/-} meurent rapidement après leurs implantations. Les cellules souches dérivées de ces embryons *Prmt1*^{-/-}, bien qu'elles soient viables en culture cellulaire, perdent leur capacité à se différencier (Pawlak et al., 2000; Yu et al., 2009). Par ailleurs, l'étude des fibroblastes embryonnaires de souris *Prmt1*^{-/-} a permis de montrer que l'hypométhylation de plusieurs protéines compromet la survie cellulaire et induit également des défauts dans la réponse aux dommages à l'ADN (Yu et al., 2009). Chez la levure, les souches déficientes pour Hmt1, l'homologue de PRMT1, sont viables mais présentent de multiples défauts tels qu'une mauvaise localisation des protéines et des altérations de remodelage de la chromatine (Gary et al., 1996; Henry and Silver, 1996; Shen et al., 1998; Yu et al., 2006).

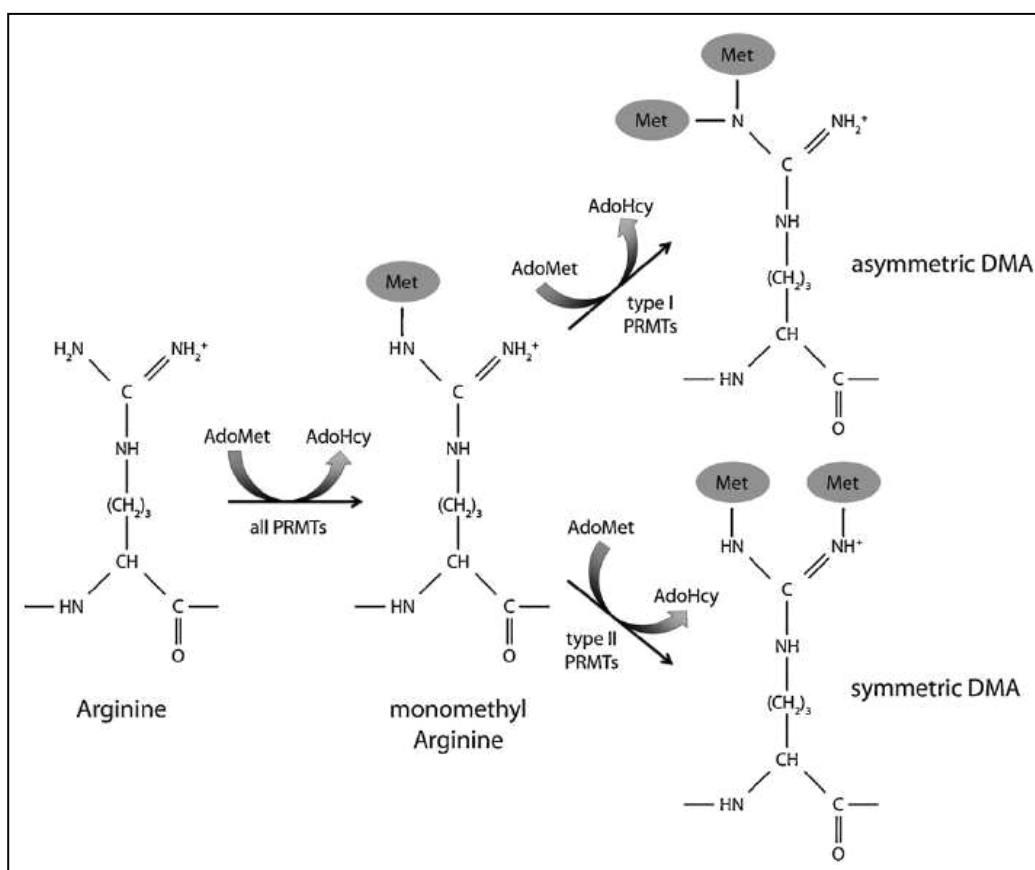


Figure 27: La méthylation des résidus arginines (D'après Nicholson et al, 2009).

2) Fonction cellulaire de PRMT1

(a) Régulation de la transcription

PRMT1 est impliqué dans la méthylation des histones, influençant ainsi la transcription régulée par les récepteurs nucléaires et les complexes de remodelage de la chromatine (Lee et al., 2005; Wysocka et al., 2006). PRMT1 est méthyle l'arginine 3 de l'histone H4 entraînant soit le recrutement de facteurs de transcription, soit des complexes de remodelage de la chromatine qui vont engendrer d'autres modifications d'histones telle que l'acétylation des lysines permettant l'ouverture de la chromatine et l'activation de la transcription (Guendel et al., 2010; Li et al., 2010; Yang et al., 2010). PRMT1 est ainsi décrit comme un coactivateur transcriptionnel recruté par un grand nombre de facteurs sur les sites d'initiation de la transcription. De plus, PRMT1 peut jouer un rôle dans l'élongation de la transcription *via* sa capacité à méthyler le facteur d'élongation SPT5 et par conséquent réguler son interaction avec l'ARN pol II (Kwak et al., 2003).

(b) Métabolisme des ARNm

Comme nous l'avons vu dans tout au long des rappels bibliographiques, les RBP participent à la maturation, la conformation, la stabilisation, la localisation des ARN et à la traduction des ARNm. La plupart d'entre elles possède des motifs GAR et s'avère pour la plupart être la cible de PRMT1. La méthylation des arginines a ainsi été décrite comme facilitant la formation de complexes ribonucléoprotéiques et leur export vers le cytoplasme (Xu and Henry, 2004; Yu et al., 2004). L'un des exemples les mieux connus concerne la protéine Sam68 (Src associated in mitosis), un substrat préférentiel de PRMT1 impliqué dans l'épissage alternatif dont la délétion du site de méthylation cause l'accumulation de cette protéine dans le cytoplasme et empêche sa liaison aux ARN dans le noyau (Côté et al., 2003). D'autres travaux ont rapporté que de nombreuses RBP n'adoptent pas leur localisation cellulaire habituelle lorsqu'elles sont hypométhylées (Lukong and Richard, 2004; Smith et al., 2004).

(c) Signalisation cellulaire

Plusieurs voies de transduction de signal semblent être régulées par la méthylation PRMT1 dépendante telles que la voie Wnt, la voie JAK-STAT et la voie Bad. En effet, il a été récemment démontré que PRMT1 méthyle la protéine pro-apoptotique Bad, conduisant à son

activation et induisant donc l'apoptose (Sakamaki et al., 2011). De plus, PRMT1 est capable d'interagir avec la protéine Axin, un régulateur de la voie Wnt, de la méthyle induisant ainsi sa stabilisation (Cha et al., 2011). De même, lors d'une stimulation oestrogénique, la méthylation par PRMT1 est le signal d'activation des voies non génomiques du récepteur ER α qui conduisent à l'activation de nombreuses voies de signalisation comme la voie PI3K/Akt et celle des MAPKs, largement impliquées dans la tumorigénèse et la résistance aux traitements (Le Romancer et al., 2008).

(d) Réparation de l'ADN

Plusieurs études ont montré en parallèle que les protéines de la réparation de l'ADN sont des cibles de la méthylation par PRMT1. En effet, il a été démontré *in vitro* que PRMT1 méthyle MRE11 (Meiotic Recombination 11), qui fait partie du complexe MRN (Mre11–Rad50–Nbs1), indispensable à la réparation des cassures double brins. La méthylation de MRE11 entraîne une perte de son activité dans la réparation de l'ADN (Boisvert et al., 2005a). Par contre, la méthylation de la protéine 53BP1, également impliquée dans la réparation de l'ADN suite aux cassures double brins, est nécessaire à son activité de liaison à l'ADN (Boisvert et al., 2005b). L'ensemble de ces résultats montre que la méthylation des arginines par PRMT1 peut, selon le contexte, jouer un rôle positif ou négatif dans la réparation de l'ADN.

C. Résumé de l'article 2

1) Caractérisation du variant hCAF1v2

Nous avons dans un premier temps analysé l'expression de chaque isoforme produit par le gène *hCaf1/cnot7* dans une variété de tissus humains. De manière générale, le transcrit hCAF1v1 est toujours détecté de façon prédominante par rapport à hCAF1v2. Nos résultats indiquent que l'ARNm hCAF1v2 est majoritairement détecté dans la glande thyroïde, l'utérus la moelle épinière et le muscle, alors que hCAF1v1 présente une expression relativement constante dans tous les différents tissus testés. Les ADNc de chaque isoforme ont été clonés dans des vecteurs d'expression eucaryote et exprimés dans des lignées cellulaires humaines. Nous avons ainsi observé des différences de localisation sub-cellulaires, puisque hCAF1v2 est majoritairement retrouvé dans le noyau alors que hCAF1v1 est principalement cytoplasmique. En parallèle, nous avons mis en évidence que la protéine hCAF1v2 s'avère être de nature

instable suite à sa dégradation par le protéasome. Par ailleurs, l'invalidation de chaque isoforme dans des cellules MCF-7 par la transfection transitoire de siRNAs spécifiques nous a permis d'établir que hCAF1v2 ne participe pas à la régulation de la voie IFN/STAT1 tel que nous l'avons décrit pour hCAF1v1 dans l'article 1.

2) Implication de hCAF1v2 dans la déadénylation

Les travaux de l'équipe ont clairement démontré que la protéine hCAF1v1 possède une activité déadénylase. En réalisant des tests de déadénylation *in vitro* avec une forme recombinante de hCAF1v2, nous avons démontré son absence d'activité déadénylase intrinsèque bien qu'elle possède les 4 résidus catalytiques DEDD. L'adressage artificiel *in cellulo* de hCAF1v2 sur un ARNm codant pour la luciférase réduit la traduction mais pas la stabilité post-transcriptionnelle de ce transcrit rapporteur. En parallèle, nous avons testé l'association de ce variant avec les protéines BTG décrites dans la régulation et le recrutement de hCAF1 sur les ARNm à dégrader. Les expériences de GST pull-down et de double-hybride en cellules humaines ont permis de démontrer l'absence d'interaction physique entre hCAF1v2 et les protéines BTG1 et BTG2. Ces données suggèrent que l'isoforme hCAF1v2 n'est pas recruté sur les ARNm de manière dépendante des BTG.

3) hCAF1v2 et la méthylation des arginines

Comme les protéines BTG, hCAF1v1 a été identifié comme un partenaire et un régulateur de l'activité arginine méthyl transférase de l'enzyme PRMT1. Nous avons donc analysé *in vitro* l'effet de hCAF1v2 sur l'activité de PRMT1 sur un substrat connu : le facteur d'épissage et d'export Sam68. Nous avons pu remarquer que hCAF1v2 régule la méthylation de Sam68 avec une efficacité supérieure à hCAF1v1. Les tests d'interaction que nous avons menés en parallèle ont permis de montrer que hCAF1v2 est un partenaire préférentiel de PRMT1. L'ensemble de ces résultats indique que l'existence de ce nouveau variant d'épissage pourrait être à l'origine de la multiplicité fonctionnelle associée au facteur hCAF1 et au complexe CCR4-NOT.

hCAF1 isoforms utilize distinct mechanisms to regulate gene expression

Clément Chapat^{1,2,4,5}, Thi Trang Luong^{1,2,4,5}, Pierre Simonet^{1,2,4,5}, Kamel Chettab^{1,2,4,5} and Laura Corbo^{1,2,4,5}

1 Université de Lyon, F-69000 Lyon, France

2 Université Lyon 1, F-69000, Lyon, France

3 Université Lyon 1, ISPB, Faculté de Pharmacie de Lyon, F-69000 Lyon, France

4 Equipe Labellisée « La Ligue »,

5 Inserm U1052CNRS UMR5286, Centre de recherche en Cancérologie de Lyon, F-69008 Lyon, France

Keywords: hCAF1 isoforms; CNOT7; CCR4-NOT, PRMT1; deadenylation

Running title: Divergent roles of hCAF1 isoforms

Address for all correspondence and requests for reprints to: Laura Corbo Centre de recherche en Cancérologie de Lyon, Centre Léon Bérard, Bâtiment Cheney D, 28 rue Laennec, 69373 Lyon Cedex 08, France. Tel: 00 33 4 78 78 26 91. Fax: 00 33 4 78 78 27 20. E-mail: laura.corbo@lyon.unicancer.fr

Disclosure: The authors have no conflicts of interest to disclose.

ABSTRACT

The CCR4-Associated Factor CAF1, also called CNOT7, is a catalytic subunit of CCR4-NOT complex which has been implicated in all aspects of the mRNA life cycle, from synthesis of mRNAs in the nucleus to their degradation in the cytoplasm. In human cells, alternative splicing of the *hCaf1* gene yields a second hCAF1 isoform leading to the formation of a shorter isoform (hCAF1 variant 2). We report that hCAF1v2 displays distinct expression in human tissues and a nuclear sub-cellular localization compared with hCAF1v1. Despite the conservation of the DEDD nuclease domain, hCAF1v2 is not able to degrade a poly(A) tail *in vitro* and is preferentially associated with PRMT1 to regulate its protein arginine methyltransferase activity. Biochemical characterizations indicate that hCAF1v2 interacts with CCR4 and CNOT1 but can not bind the BTG proteins. Altogether, our findings suggest a preferential involvement of hCAF1v2 in protein arginine methylation rather than in mRNA turnover.

INTRODUCTION

The CCR4-NOT complex is an evolutionarily conserved multi-subunit complex which regulates several aspects of eukaryotic gene expression, including the repression and activation of mRNA translation, control of mRNA elongation, deadenylation and subsequent degradation of mRNA and even protein degradation (for review, see^{1,2}). From yeast to metazoans, CCR4-NOT reduces the poly(A) tail of mRNAs to a short oligo(A) tract before the body of the mRNA is degraded by subsequent enzymatic machineries³. The deadenylase module comprises two subunits: the yeast Ccr4 protein or its human orthologues CNOT6 (hCcr4/Ccr4a) and CNOT6L (Ccr4b) which contain an exonuclease/endonuclease/phosphatase (EEP)⁴⁻⁶, and the yeast Caf1 (Pop2) or its human orthologues CNOT7 (hCaf1/Caf1a) and CNOT8 (hPop2/Caf1b/Calif) which have RNA nuclease activities attributed to DEDD⁷⁻¹⁰. CAF1 activity has been shown to be responsible in flies and human cells for miRNA-mediated deadenylation and consequent post-transcriptional silencing¹¹⁻¹³. CAF1 has been shown to localize to cytoplasmic P-bodies with translationally repressed mRNA and miRNAs^{14,15}.

Mammalian CAF1 is a crucial partner of the BTG/TOB family of antiproliferative proteins^{16,17} that are also implicated in mRNA turnover^{18,19} and transcription^{17,20,21}. Several members of this family has been described as adaptor proteins that mediate the recruitment of the CCR4-NOT complex to mRNAs^{19,22}. The hCAF1-BTG/TOB association has been shown to display an antiproliferative activity resulting of the general stimulation of

deadenylation^{18,23}. This interaction also affects estrogen receptor α - mediated transcription regulation in which both CAF1 and BTG proteins can function either as coactivator or corepressor depending on the promoter context¹⁷. CAF1 is also a transcriptional regulator of several nuclear receptors^{17,24,25}. In addition to its role in mRNA decay and transcriptional regulation, hCAF1 is a regulator of the activity of PRMT1, the predominant protein arginine methyl transferase in human cells^{26,27}. Thus hCAF1 regulates the asymmetric dimethylation of two PRMT1 substrates, Sam68 and histone H4. This association has also been reported in yeast and is required to control mRNA export²⁸. Recently, human CAF1 has been described as a negative regulator of IFN signalling pathway, acting both in the repression of STAT1 activity and the decay of IFN-target mRNAs²⁹.

To investigate the functions of CAF1 *in vivo*, *caf1*^{-/-} mice have been generated by two groups. Male *caf1*-deficient mice are infertile due to an impaired maturation of spermatogenic cells that leads to multiple defects during spermatids differentiation³⁰. Nakamura *et al.* have shown that the testicular phenotypes of *caf1*^{-/-} mice are similar to those of mice deficient in retinoid X receptor beta and that CAF1 binds the AF-1 domain of RXR β to modulate its transcriptional activity²⁴. In *C. Elegans*, CAF1 is essential for embryonic and larval development³¹. In plants, CAF1 has been shown to be involved in both development and response to biotic stresses and pathogen infection^{32,33}.

Despite the increased evidence of the involvement of CAF1 in a wide variety of biological processes, relatively little is known about how CAF1 can integrate these multiple pathways. One mechanism may be provided by a modulation of its interactions with different partners and by its cellular compartmentalisation. The protein hCAF1 has been described to localise in the speckles, a sub-nuclear compartment enriched in many pre-mRNA splicing factors and in which the proteins have been shown to be highly mobile and continuously exchanged between the different cellular subcompartments and the nucleoplasm³⁴. The sub-cellular localization of hCAF1 and its interactions with distinct BTG2-containing CCR4 complexes appear also to be strongly dependent on cell-cycle progression³⁵. Another possibility could be that alternative splicing of the human *Caf1* gene yields a second distinct transcript, hCAF1v2, giving a 41-residue shorter protein at its C-terminal extremity. Although a growing number of data are emerging concerning the function of hCAF1, none characterization has been reported concerning hCAF1v2 functions.

Here we described the expression of hCAF1v2 in a wide variety of human tissues and that hCAF1v2 is present predominantly in the nucleus. Biochemical characterizations revealed that hCAF1v2 does not display a deadenylase activity *in vitro* and is not able to interact with

BTG proteins. Moreover, we demonstrated that hCAF1v2 associates with human CCR4 and CNOT1, is a preferential partner of PRMT1 and is involved in the regulation of arginine methylation.

Results

Characterization of the hCAF1v2 isoform

The observation initiating this study was the detection by western blot analysis of two hCAF1 protein forms in HeLa cells: a form at the attending molecular mass of 32 kDa and a slower migrating form at 30 kDa. By comparing available ESTs with human CAF1 genomic sequence, we found that hCAF1 has two splicing variants, which might explain the occurrence of two bands in the western blot. The shorter mRNA isoform hCAF1v2 is produced by an alternative splicing concerning the last coding exon leading to a lack of 41-amino-acid sequence at its C terminus and a divergent 3' UnTranslated Region (3' UTR) (figure 1A). It is unknown, however, whether this variant isoform is translated into a functional protein.

As a first step we analyzed whether the protein was detected by western blot in the MCF7 cell line using the anti-hCAF1 affinity-purified polyclonal antibody previously described²⁶. As shown in the figure 1B, anti-hCAF1 antibody detected, in addition to the 32 kD protein, a slower migrating band that disappeared in cells treated with two siRNAs specifically targeting hCAF1v2, thus confirming the identity of the signal (figure 1 B) These data demonstrated that the hCAF1v2 variant is expressed in the MCF-7 cell line. Then we analyzed the relative expression levels of the two hCAF1 isoforms in human normal tissues by quantitative RT-PCR using the expression level of the 28S gene as an internal control. These analyses indicate that the two hCAF1 isoforms are co-expressed in most target tissues; with the highest levels for hCAF1v1. However, the ratio can vary considerably depending on cell type (see fig 1 C). We next examined the sub-cellular localization of each isoform in human cells. As previously described endogenous hCAF1 localizes in both the cytoplasm and in nuclear speckles²⁶ (Fig. 2 A). Since the anti-hCAF1 antibody recognizes both isoforms, we transfected MCF-7 with plasmids expressing tagged hCAF1 isoforms and the intracellular distribution of each flag-hCAF1 isoform was analysed by IF. Interestingly hCAF1v2 expression resulted in a predominantly punctuated nuclear staining, although hCAF1v1 showed a predominant

cytosolic localization (figure 2 B). Thereby, this differential localization suggests a functional divergence between the hCAF1 isoforms.

hCAF1v2 does not display an intrinsic deadenylase activity

The CAF1 protein is a member of the DEDD superfamily 3'-5' exonucleases, characterized by the presence of four acidic amino acids: three aspartates (D) and one glutamate (E). These residues involved in catalysis in the RNase D subfamily are conserved in both hCAF1v1 and hCAF1v2 proteins. We then tested whether human hCAF1v2 was also active in mRNA degradation *in vitro* as we described for v1 form⁸. Recombinant proteins of both isoforms were incubated with a 5'- end biotine-labeled synthetic RNA oligonucleotide (RNA7A) ending with seven A residues at its 3'. Time-course reactions were performed with various quantities of the recombinant factor. Reaction products were resolved on urea-polyacrylamide gels and detected by streptavidine-mediated chemiluminescence. These analyses confirmed that the recombinant hCAF1v1 protein was able to degrade the substrate RNA, as shorter products absent from the starting substrates appeared with time (Fig. 3A). Conversely the recombinant hCAF1v2 was unable to degrade the synthetic RNA. We also used as a control a 5' biotine-labeled RNA oligonucleotide ending with 10 C at its 3' end (RNA10C). This molecule was completely stable in the presence of hCAF1v1 confirming its strong specificity toward A residues at the 3' end of the substrate and its inability to act endonucleolytically (figure 3C). These data indicate that the 41 last C-terminal residues, present in hCAF1v1 but deleted during splicing in hCAF1v2, are crucial to maintain the deadenylase activity of the longer variant, at least *in vitro*. Moreover because we cannot rule out that the protein v2 could be active in a cellular context, we tested its activity using the RNA tethering assays. A Renilla luciferase reporter mRNA containing five BoxB sequences in the 3' UTR was expressed in combination with plasmids expressing hCAF1 isoforms fused to a λ N peptide, which has high affinity for the BoxB sequences (figure 3C). Recruitment to the 3' UTR of hCAF1v1 resulted in a marked (>80%) reduction of luciferase reporter activity. A reduction of reporter activity was also observed upon expression of λ N-hCAF1v2, but to a lesser extent (approximately 60%). Interestingly, while the level of the mRNA reporter was also strongly decreased upon expression of λ N-hCAF1v1, this decreasing was not observed upon the expression of λ N-hCAF1v2 (figure 3D). Thus, we can suppose that the inhibition of reporter expression observed after hCAF1v2 expression is the result of a translational repression, independently of intrinsic deadenylase activity.

Much evidence has been accumulated indicating that CAF1v1 protein is recruited to the mRNA *via* the interactions with BTG/TOB protein family and with RNA binding proteins^{19,36,37}. In line with this model, artificial tethering of BTG2 and TOB1 results in enhancement of mRNA decay. We next examined an interaction between hCAF1v2 and the BTG1 and BTG2 proteins using the mammalian two-hybrid system in HEK-293T cells as described^{16,17}. As shown in Figure 3 E and F, we confirmed the interactions of hCAF1v1 with both proteins. We validated this point by using GST pull-down assay between GST-hCAF1v1 or v2 and in vitro-translated flag-BTG1 or BTG2. Therefore, we clearly demonstrated that the isoform 2 of hCAF1 was not able to interact with BTG proteins, suggesting that hCAF1v2 is not recruited onto mRNAs in a BTG/TOB-dependent manner.

hCAF1v2 is a member of CCR4-NOT

The above data, supporting the idea of a functional divergence between the two hCAF1 isoforms, prompted us to verify the presence of hCAF1v2 in the CCR4-NOT complex. It has been described that the conserved core of the CCR4-NOT complex consists of a catalytic module containing CAF1, CCR4 and the NOT module and that CNOT1 bridges the interaction between the two modules and therefore, acts as a scaffold protein for the assembly of the complex^{38,39}. To shed light on the presence of hCAF1v2 in the CCR4-NOT complex, we performed coimmunoprecipitation experiments. Vector expressing V5-tagged hCAF1v1 or v2 were transfected into HEK293T cells, together with a Flag-tagged CNOT1. Lysates of transfectants were subjected to anti-Flag immunoprecipitation, followed by immunoblotting with anti-V5 antibody (Figure 4A.). As expected, CNOT1 can bind to V5-hCAF1v1. Similarly, we observed that V5-hCAF1v2 was coimmunoprecipitated with Flag-CNOT1. GST pull-down assays were performed to investigate whether hCCR4 directly interacted with hCAF1v2. As shown in Figure 4B, a specific retention of in vitro-translated hCCR4 was observed with GST-hCAF1v2, but in a lesser extent compared with GST-hCAF1v1. We then examined by coimmunoprecipitation experiments whether this interaction occurred with the endogenous hCCR4 proteins. Lysates from HEK293T cells transfected with vector expressing Flag-tagged hCAF1v1 or v2 were subjected to anti-Flag immunoprecipitation, followed by immunoblotting with anti-hCCR4 antibody (Figure 4C). The interaction between hCCR4 and Flag-hCAF1 variants was detected, although hCCR4 seems to interact less stably with hCAF1v2 than with hCAF1v1. These experiments suggest that the hCAF1v2 variant displays physical affinity for the members of CCR4-NOT complex.

Regulation of methyl transferase activity of PRMT1 by hCAF1 proteins

Previous report demonstrated that endogenous hCAF1v1 regulates the arginine methyl transferase activity of PRMT1 and that these proteins interact *in vivo* and co-localize in nuclear speckles²⁶. Given the localization of hCAF1v2 in nuclear structures, we hypothesized a functional link between this isoform and the PRMT1 enzyme. GST pull-down assays were performed to investigate whether PRMT1 directly interacted with hCAF1v2. As shown in Fig. 5A, a specific retention of hCAF1v2 with GST-PRMT1 was observed. A weaker interaction was also detected with the *in vitro* translated hCAF1v1, but the molecular weight of the interacting band appeared lower than the full-length protein and co-migrated with hCAF1v2. We confirmed the preferential association of PRMT1 with the shorter variant v2 by mammalian two-hybrid assay using VP16-hCAF1v1/v2 and GAL4-PRMT1-expressing vectors (Figure 5B). Thus PRMT1 seems even to display a stronger affinity with hCAF1v2 than with the longer isoform. We then investigated whether the hCAF1 isoform could affect the methylation level of a target of PRMT1, SAM68. An *in vitro* methylation assay was performed in the presence of *S*-adenosyl[methyl-³H]-l-methionine as a methyl donor, using recombinant GST-PRMT1, which is enzymatically active when incubated with GST-SAM68P3. Figure 5C shows a stronger inhibition of PRMT1 activity when incubated with hCAF1v2, suggesting its high ability to regulate PRMT1 function. Increasing amounts of GST, used as control, had no effect on SAM68 methylation. To further analyze the relationship of PRMT1 and hCAF1 variants in the context of intact cells and to confirm the effect of hCAF1 on endogenous SAM68, we over-expressed flag-hCAF1v1 or flag-hCAF1v2 in MCF-7 cells and performed immunoprecipitation experiments on cell lysates using an anti-SAM68 antibody. Western blot with anti-SAM68 antibody confirmed that a similar amount of protein was immunoprecipitated at each point. We then immunoblotted these extracts with anti-PRMT1 and anti-flag antibodies. Results showed that the overexpression of flag-hCAF1v2 increased the association between endogenous PRMT1 and SAM68. We also detected in a preferential interaction between SAM68 and hCAF1v2 (Figure 5D). Together with *in vitro* experiments, these results demonstrated that hCAF1v2 regulated SAM68 methylation, perhaps by increasing the recruitment of PRMT1.

Discussion

The control of cellular homeostasis involves the regulation and the coordination of many molecular processes. The protein hCAF1 has been shown to be involved in regulation of

transcription, mRNA metabolism and even protein turnover. We described herein for the first time that at least two hCAF1 isoforms originate from the human gene *Caf1* by alternative splicing. The shorter isoform, called hCAF1v2, appears to display functional divergences toward its well-characterized isoform hCAF1v1.

Numerous biochemical and genetic analyses have confirmed a direct involvement of hCAF1v1 in the deadenylation process, resulting in mRNA decay⁴⁰. As a consequence, we investigated the possible conservation by hCAF1v2 of the deadenylase activity. *In vitro* deadenylation assays have clearly shown the absence of deadenylase activity of hCAF1v2, although the conservation of its exonuclease domain. These results indicate that the 41 C-terminal residues, specific of hCAF1v1, constitute a crucial region for the deadenylation function of hCAF1, at least *in vitro*. Furthermore we tested the capacity of hCAF1v2 to regulate mRNA abundance and translation, using RNA tethering assay. Artificial recruitment of this protein to the reporter gene mRNA induced the inhibition of reporter protein expression without decreasing of the amount of reporter gene mRNA. Together, these results indicate that hCAF1v2 lacks of deadenylase activity, whereas seems to be involved in the regulation of translation, contrary to the full-length hCAF1. Future work will be needed to determine this crucial aspect of hCAF1 function.

Consistently, our data indicate the absence of interaction between hCAF1v2 and BTG2, described as general activators of mRNA decay by increasing the deadenylase activity of hCAF1v1^{18,19}. Other data from Prévôt *et al.* and Nishida *et al.* consolidate this observation by identifying several residues in the C-terminal region deleted in hCAF1v2 as essential for the association with the BTG/Tob proteins^{17,41}. These data suggest the exclusion of hCAF1v2 from the functional circuit involving hCAF1v1 and the BTG/Tob proteins in a deadenylase-dependent antiproliferative mechanism.

Because the major deadenylase activity is associated with the CCR4 subunit and hCAF1 is known for the recruitment of CCR4 to the CCR4-NOT complex and to interact with the scaffold protein NOT1^{38,39}, we also analysed whether hCAF1v2 interacts with these proteins. Our results indicate that this novel hCAF1 isoform is a component of the CCR4-NOT complexes. Nevertheless hCCR4 seems to interact less stably with hCAF1v2 than with hCAF1v1. It is plausible that hCAF1v1 and hCAF1v2 are in separate complexes and are competing for the same binding site on CNOT1. Regarding the absence of deadenylase activity of hCAF1v2 and its weak affinity for hCCR4, the association of hCAF1v2 with CNOT1 could strongly alter the deadenylase function of CCR4-NOT.

This functional peculiarity of hCAF1v2 prompted us to analyse if this isoform was able to interact and regulate the arginine methyl transferase PRMT1 as we described for hCAF1v1²⁶. Remarkably, our results strongly indicated that hCAF1v2 displayed a better affinity for PRMT1 than hCAF1v1 leading to a better ability to regulate PRMT1 function in vitro and in vivo, on a well known target of PRMT1 methylation, the protein SAM68. Interestingly our data indicate that hCAF1v2 regulated Sam68 methylation by increasing the recruitment of PRMT1.

Finally we have recently reported that hCAF1 negatively regulates the expression of a subset of IFN-regulated genes such as *Ifi27*, *Ifi6* and *Ifitm1*²⁹. Consistent, hCAF1 silencing enhanced the expression of these genes. So, we tested whether hCAF1v2 was involved in this process by transitory knocking down the expression of each hCAF1 isoform. siRNA duplexes targeting either hCAF1v2 or hCAF1v1 were designed to target their divergent 3'UTRs. The analysis of the mRNA level produced by the *Ifi27* gene indicated that only hCAF1v1, not hCAF1v2, is required to regulate the IFN-target genes (Supplementary Figure 1).

Consistent with the functional diversity of the two hCAF1 isoforms, we found that they possess a differential localization in the cell: hCAF1v1 localizes essentially in the cytoplasm while hCAF1v2 appears as the preferential nuclear form (figure 2). These results are consistent with and clarify our previous data showing that the cellular localization pattern hCAF1 was variable through the cell cycle progression, suggesting that its sub-cellular localization might influence its biological activity³⁵. Moreover, the sequence of both hCAF1 isoforms contains a potential basic nuclear localization motif beginning with the sequence Met-Lys-Lys at their N-terminus, and hCAF1v1 has been described as a nuclear-cytoplasmic shuttling protein^{42,43}. Given the potential localization of hCAF1v2 in the speckles and of hCAF1v1 in the p-bodies, to understand the functional divergence existing between the two variants, a complex mode of regulation involving the cell cycle progression and the nuclear export mechanisms has to be considered

Importantly our results indicate that the two hCAF1 isoforms are not functionally redundant showing distinct activities: hCAF1v1 has a strong deadenylase activity, whereas this activity is not conserved in hCAFv2. In addition, hCAFv2 show a strong affinity for the arginine methyl transferase PRMT1 suggesting that the shorter isoform could be a preferential regulator of methylation. Further work will be required to consolidate the understanding of the mechanisms used by each isoform to regulate gene expression.

Bibliography

1. Collart, M. A. & Panasenko, O. O. The Ccr4--not complex. *Gene* **492**, 42–53 (2012).
2. Miller, J. E. & Reese, J. C. Ccr4-Not complex: the control freak of eukaryotic cells. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **47**, 315–333 (2012).
3. Garneau, N. L., Wilusz, J. & Wilusz, C. J. The highways and byways of mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 113–126 (2007).
4. Morita, M. *et al.* Depletion of mammalian CCR4b deadenylase triggers elevation of the p27Kip1 mRNA level and impairs cell growth. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 4980–4990 (2007).
5. Dupressoir, A. *et al.* Identification of four families of yCCR4- and Mg²⁺-dependent endonuclease-related proteins in higher eukaryotes, and characterization of orthologs of yCCR4 with a conserved leucine-rich repeat essential for hCAF1/hPOP2 binding. *Bmc Genomics* **2**, 9 (2001).
6. Chen, J., Chiang, Y.-C. & Denis, C. L. CCR4, a 3'-5' poly(A) RNA and ssDNA exonuclease, is the catalytic component of the cytoplasmic deadenylase. *Embo J.* **21**, 1414–1426 (2002).
7. Dageron, M. C., Mauxion, F. & Séraphin, B. The yeast POP2 gene encodes a nuclease involved in mRNA deadenylation. *Nucleic Acids Res.* **29**, 2448–2455 (2001).
8. Bianchin, C., Mauxion, F., Sentis, S., Séraphin, B. & Corbo, L. Conservation of the deadenylase activity of proteins of the Caf1 family in human. *Rna New York N* **11**, 487–494 (2005).
9. Clark, L. B. *et al.* Systematic mutagenesis of the leucine-rich repeat (LRR) domain of CCR4 reveals specific sites for binding to CAF1 and a separate critical role for the LRR in CCR4 deadenylase activity. *J. Biol. Chem.* **279**, 13616–13623 (2004).
10. Viswanathan, P., Ohn, T., Chiang, Y.-C., Chen, J. & Denis, C. L. Mouse CAF1 can function as a processive deadenylase/3'-5'-exonuclease in vitro but in yeast the deadenylase function of CAF1 is not required for mRNA poly(A) removal. *J. Biol. Chem.* **279**, 23988–23995 (2004).
11. Fabian, M. R. *et al.* Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation. *Mol. Cell* **35**, 868–880 (2009).
12. Eulalio, A. *et al.* Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *Rna New York N* **15**, 21–32 (2009).
13. Behm-Ansmant, I. *et al.* mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.* **20**, 1885–1898 (2006).
14. Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., Schweizer, D. & Izaurralde, E. P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 3970–3981 (2007).
15. Zheng, D. *et al.* Deadenylation is prerequisite for P-body formation and mRNA decay in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **182**, 89–101 (2008).
16. Rouault, J. P. *et al.* Interaction of BTG1 and p53-regulated BTG2 gene products with mCaf1, the murine homolog of a component of the yeast CCR4 transcriptional regulatory complex. *J. Biol. Chem.* **273**, 22563–22569 (1998).
17. Prévôt, D. *et al.* Relationships of the antiproliferative proteins BTG1 and BTG2 with CAF1, the human homolog of a component of the yeast CCR4 transcriptional complex: involvement in estrogen receptor alpha signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 9640–9648 (2001).
18. Mauxion, F., Faux, C. & Séraphin, B. The BTG2 protein is a general activator of mRNA deadenylation. *Embo J.* **27**, 1039–1048 (2008).

19. Ezzeddine, N. *et al.* Human TOB, an antiproliferative transcription factor, is a poly(A)-binding protein-dependent positive regulator of cytoplasmic mRNA deadenylation. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 7791–7801 (2007).
20. Passeri, D. *et al.* Btg2 enhances retinoic acid-induced differentiation by modulating histone H4 methylation and acetylation. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 5023–5032 (2006).
21. Tzachanis, D. *et al.* Tob is a negative regulator of activation that is expressed in anergic and quiescent T cells. *Nat. Immunol.* **2**, 1174–1182 (2001).
22. Funakoshi, Y. *et al.* Mechanism of mRNA deadenylation: evidence for a molecular interplay between translation termination factor eRF3 and mRNA deadenylases. *Genes Dev.* **21**, 3135–3148 (2007).
23. Doidge, R., Mittal, S., Aslam, A. & Winkler, G. S. The anti-proliferative activity of BTG/TOB proteins is mediated via the Caf1a (CNOT7) and Caf1b (CNOT8) deadenylase subunits of the Ccr4-not complex. *Plos One* **7**, e51331 (2012).
24. Nakamura, T. *et al.* Oligo-astheno-teratozoospermia in mice lacking Cnot7, a regulator of retinoid X receptor beta. *Nat. Genet.* **36**, 528–533 (2004).
25. Garapaty, S., Mahajan, M. A. & Samuels, H. H. Components of the CCR4-NOT complex function as nuclear hormone receptor coactivators via association with the NRC-interacting Factor NIF-1. *J. Biol. Chem.* **283**, 6806–6816 (2008).
26. Robin-Lespinasse, Y. *et al.* hCAF1, a new regulator of PRMT1-dependent arginine methylation. *J. Cell Sci.* **120**, 638–647 (2007).
27. Bedford, M. T. & Richard, S. Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol. Cell* **18**, 263–272 (2005).
28. Kerr, S. C. *et al.* The Ccr4-Not complex interacts with the mRNA export machinery. *Plos One* **6**, e18302 (2011).
29. Chapat, C. *et al.* hCAF1/CNOT7 regulates interferon signalling by targeting STAT1. *Embo J.* **32**, 688–700 (2013).
30. Berthet, C. *et al.* CCR4-associated factor CAF1 is an essential factor for spermatogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 5808–5820 (2004).
31. Molin, L. & Puisieux, A. C. elegans homologue of the Caf1 gene, which encodes a subunit of the CCR4-NOT complex, is essential for embryonic and larval development and for meiotic progression. *Gene* **358**, 73–81 (2005).
32. Liang, W. *et al.* The Arabidopsis homologs of CCR4-associated factor 1 show mRNA deadenylation activity and play a role in plant defence responses. *Cell Res.* **19**, 307–316 (2009).
33. Sarowar, S. *et al.* Capsicum annuum CCR4-associated factor CaCAF1 is necessary for plant development and defence response. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **51**, 792–802 (2007).
34. Lamond, A. I. & Spector, D. L. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 605–612 (2003).
35. Morel, A.-P. *et al.* BTG2 antiproliferative protein interacts with the human CCR4 complex existing in vivo in three cell-cycle-regulated forms. *J. Cell Sci.* **116**, 2929–2936 (2003).
36. Hosoda, N. *et al.* Anti-proliferative protein Tob negatively regulates CPEB3 target by recruiting Caf1 deadenylase. *Embo J.* **30**, 1311–1323 (2011).
37. Ezzeddine, N., Chen, C.-Y. A. & Shyu, A.-B. Evidence providing new insights into TOB-promoted deadenylation and supporting a link between TOB's deadenylation-enhancing and antiproliferative activities. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 1089–1098 (2012).
38. Basquin, J. *et al.* Architecture of the Nuclease Module of the Yeast Ccr4-Not Complex: the Not1-Caf1-Ccr4 Interaction. *Mol. Cell* (2012). doi:10.1016/j.molcel.2012.08.014

39. Petit, A.-P. *et al.* The structural basis for the interaction between the CAF1 nuclease and the NOT1 scaffold of the human CCR4-NOT deadenylase complex. *Nucleic Acids Res.* **40**, 11058–11072 (2012).
40. Doidge, R., Mittal, S., Aslam, A. & Winkler, G. S. Deadenylation of cytoplasmic mRNA by the mammalian Ccr4-Not complex. *Biochem. Soc. Trans.* **40**, 896–901 (2012).
41. Nishida, K. *et al.* Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the Tob-hCaf1 complex. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **63**, 1061–1063 (2007).
42. Yamashita, A. *et al.* Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 1054–1063 (2005).
43. Bogdan, J. A. *et al.* Human carbon catabolite repressor protein (CCR4)-associative factor 1: cloning, expression and characterization of its interaction with the B-cell translocation protein BTG1. *Biochem. J.* **336** (Pt 2), 471–481 (1998).

Figure legends

Figure 1: Characterization of hCAF1 isoforms. (A) Schematic representation of the hCAF1 gene leading to the formation of the two hCAF1 isoforms, hCAF1v1 and hCAF1v2, *via* an alternative splicing. (B) Extracts (20µg) from MCF-7 cells transfected with scramble (Sc) or specific hCAF1 siRNA duplexes were analyzed by western blotting with the anti-hCAF1 (line 1) or the anti-GAPDH (line 2) antibodies. Two different siRNA duplexes targeting hCAF1v2 were tested and designed v2.1 and v2.2. (C) Expression of hCAF1 isoforms in human tissues. Total RNA isolated from human tissues was reverse transcribed, and PCR was performed with primers specific for the transcripts of the indicated genes. Gene expression levels were normalized to internal control 28S.

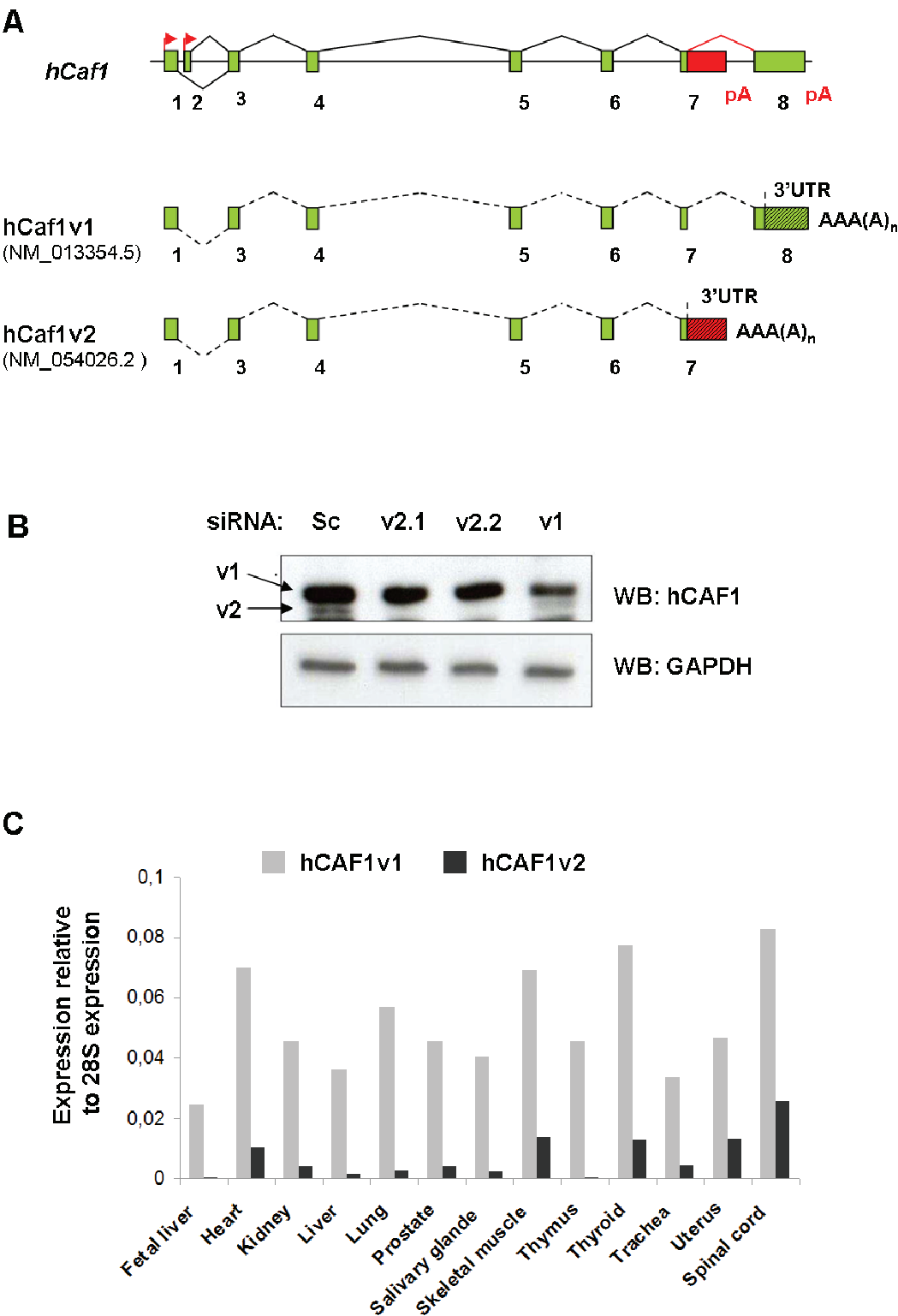
Figure 2: Sub-cellular localization of hCAF1 proteins in MCF-7 cells. (A) Immunofluorescence microscopy was used to analyse the subcellular localization of the endogenous hCAF1 proteins in MCF-7 cells by using a mouse polyclonal anti-hCAF1 antibody. (B) Sub-cellular localization of the hCAF1 isoforms. Immunofluorescence labelling was performed following transfection of MCF-7 cells with the pSG5-Flag (a), pSG5-Flag-hCAF1v1 (b) or v2 (c). Cells were fixed in cold methanol after a 48 hours growth and anti-flag antibody was used. Cells were mounted on glass slides and the microscopic analyses were directly performed. Scale bar: 40 µm.

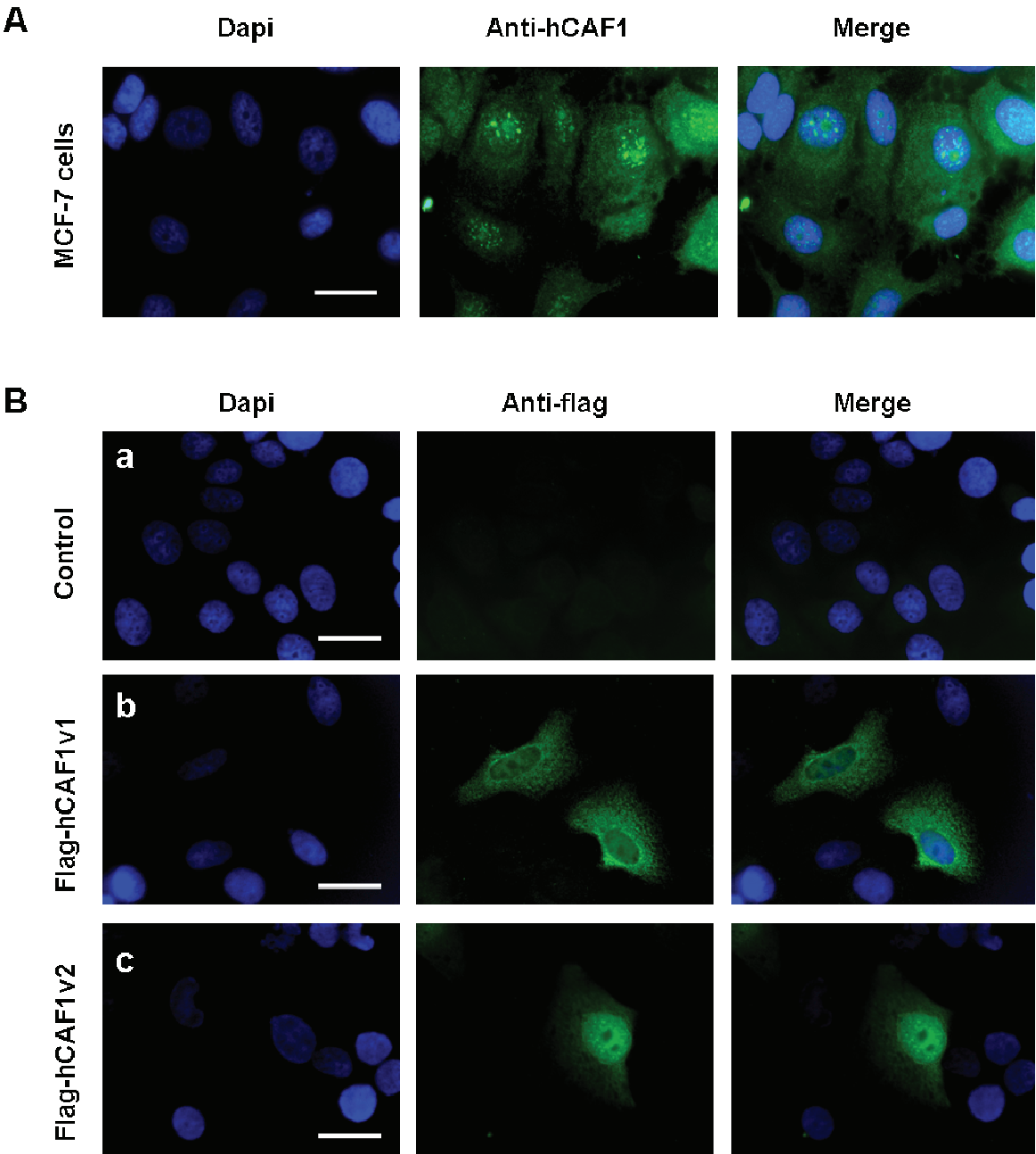
Figure 3: deadenylation activity of hCAF1 isoforms: (A) hCAF1v2 do not display a deadenylase activity in vitro. A 5' end-labelled synthetic RNA oligonucleotide ending with seven A residues were incubated with 10 pmol of the recombinant proteins at 30°C for the indicated times. The products of RNA degradation were analysed on acrylamide-urea gel, electroblotted on a membrane and revealed by streptavidine-mediated chemiluminescence. 150 fmol were used per reaction. (B) The same reaction as (A) was performed by using an oligonucleotide ending by ten C nucleotides. (C) Schematic representation of the reporter mRNA containing coding sequences for the Renilla luciferase enzyme and five BoxB sequences in the 3' UTR. Recruitment of hCAF1v1 or hCAF1v2 to the 3' UTR was mediated by the fused λ N peptide, which has high affinity for the BoxB sequence. The lower panel shows the expression of λ N-V5-fused hCAF1 proteins. (D) Recruitment of both hCAF1 isoforms to the 3' UTR of a reporter gene differentially affects reporter activity. MCF-7 cells were cotransfected with three plasmids: one expressing the *Renilla*-Luc-5BoxB reporter, another expressing the λ N-V5 peptide or λ N-V5-hCAF1v1 or -v2, and a third expressing Firefly luciferase (F-Luc). *Renilla* luciferase activity (black bars) and mRNA levels (grey bars) were normalized to those of the Firefly luciferase and set at 100 in cells expressing the λ N-V5 peptide. (E) Mammalian two-hybrid assay was used to analyse the interaction of hCAF1 variants with BTG1 and BTG2. The pG4-TK-Luc reporter plasmid contains six GAL4 binding elements, upstream of the thymidine kinase minimal promoter (TK) region fused to the luciferase reporter gene. MCF-7 cells were cotransfected with a combination of expression vectors and luciferase activities were measured two days post transfection and are expressed as the fold increase over the luciferase activity of the reporter vector alone. Initiation of luciferase reporter gene was detected in case of co-transfection GAL4-BTG1 and GAL4-BTG2 with VP16-hCAF1v1 but not hCAF1v2. Bars indicate standard deviation of the mean for at least three independent transfections. (F) Direct interaction between hCAF1v1, not v2, with BTG proteins by GST-pulldown experiments. *In vitro* translated flag-tagged BTG1 and BTG2 were incubated with equivalent amounts of GST, GST-hCAF1v1 or GST-hCAF1v2 bounded to glutathione-Sepharose beads. The input (10%) and eluted proteins were analyzed by immunoblotting using anti-Flag antibody. GST fusion proteins used in this assay were shown by Coomassie blue stain (Supplementary Figure 2).

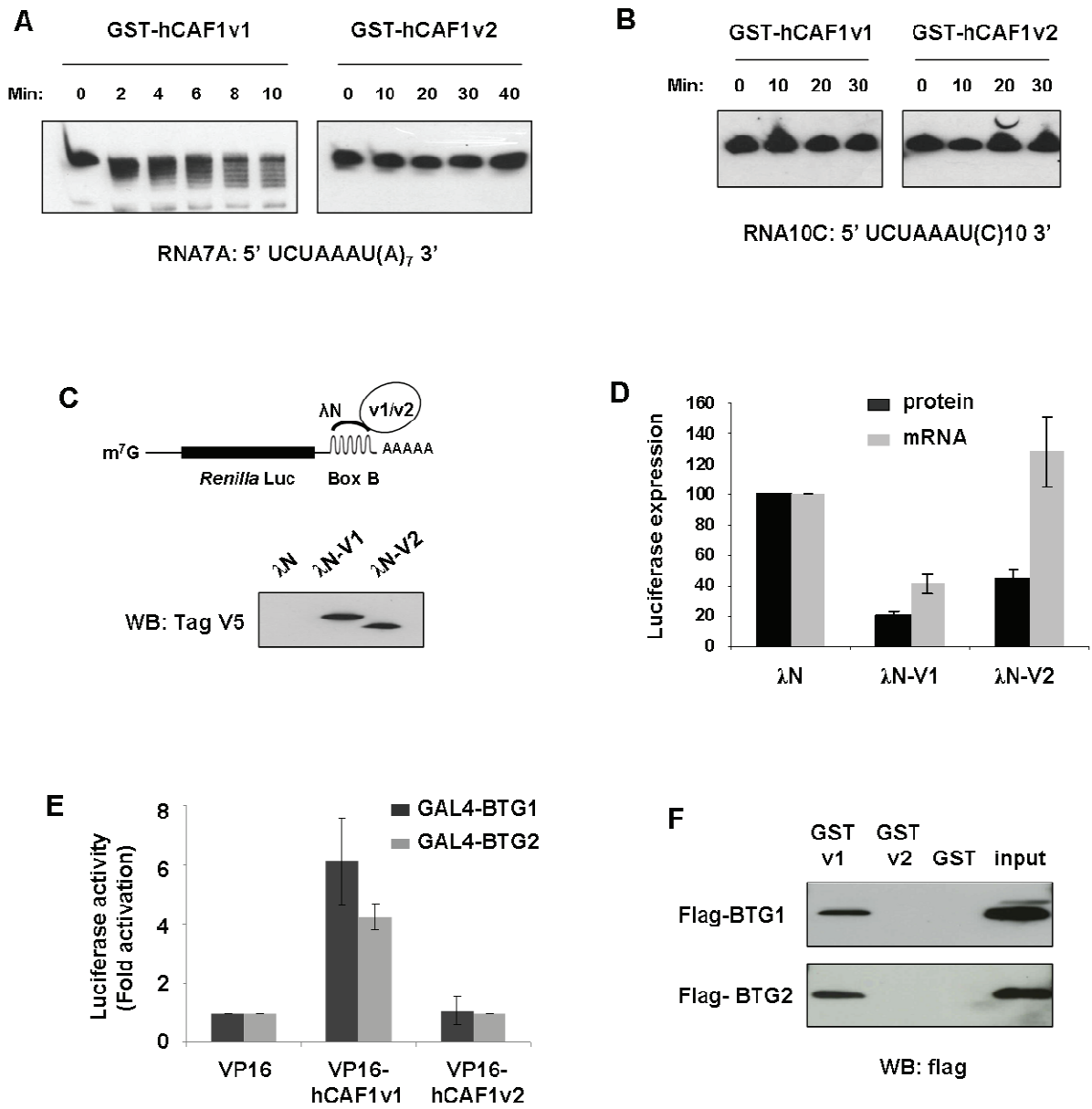
Figure 4: hCAF1v2 interacts with CCR4 and CNOT1. (A) Interaction of hCAF1 isoforms with CNOT1. Vectors expressing Flag-CNOT1 and V5-hCAF1v1 or v2 (or control plasmid)

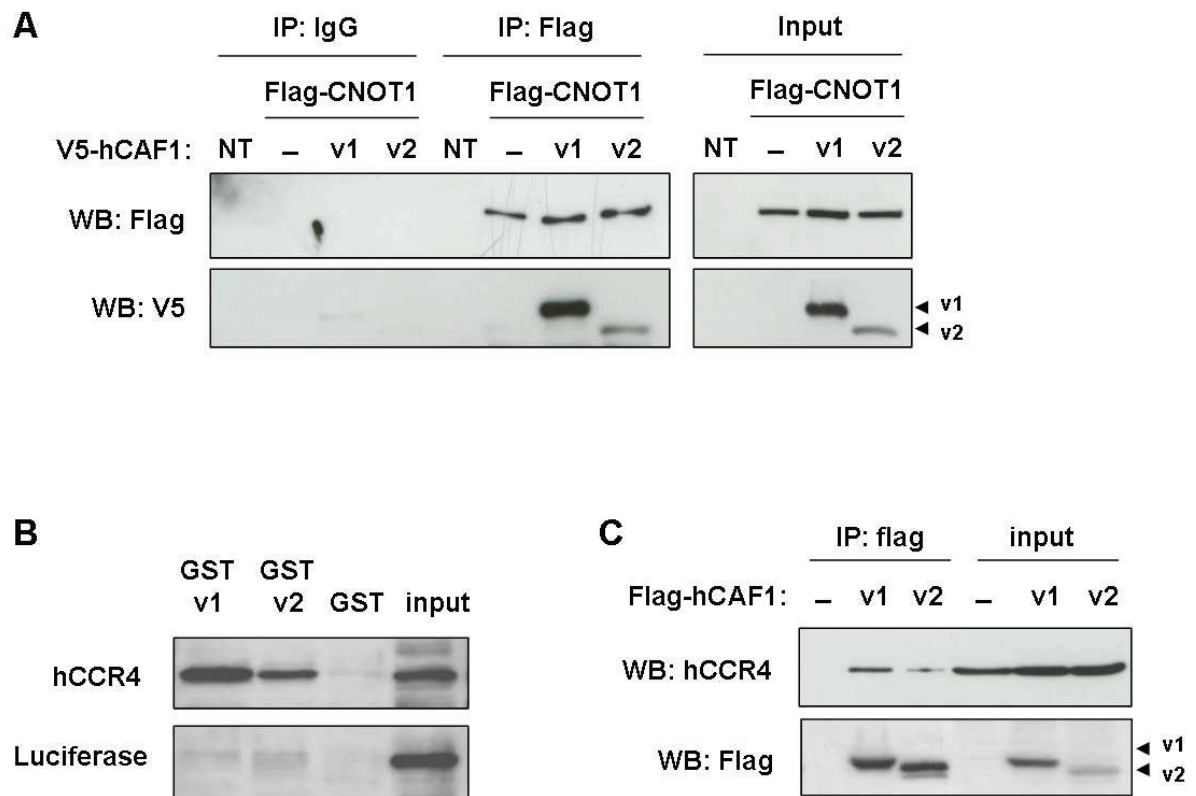
were transfected into HEK293T cells. Proteins from non transfected (NT) or transfected cells were immunoprecipitated (IP) with either normal mouse IgG or anti-Flag antibody. Total lysates (input) and anti-Flag immunoprecipitation were analyzed with the indicated antibodies. **(B)** Direct interaction between hCAF1v2 and hCCR4 was analysed by GST-pulldown experiments. *In vitro* translated biotin-labelled hCCR4 was incubated with equivalent amount of GST, GST-hCAF1v1 or GST-hCAF1v2 bounded to glutathione-Sepharose beads. The input (10%) and eluted proteins were analysed by SDS-PAGE, electroblotted on a membrane and revealed by streptavidine-mediated chemiluminescence. Biotin-labelled luciferase was tested in parallel as a negative control. GST fusion proteins used in this assay were shown by Coomassie blue stain (Supplementary Figure 2). **(C)** Interaction of Flag-hCAF1 variants with endogenous hCCR4. Vectors expressing Flag-hCAF1v1 or v2 (or control plasmid) were transfected into HEK293T cells. Lysates of transfectants were subjected to anti-Flag immunoprecipitation, followed by immunoblotting with anti-hCCR4 antibody.

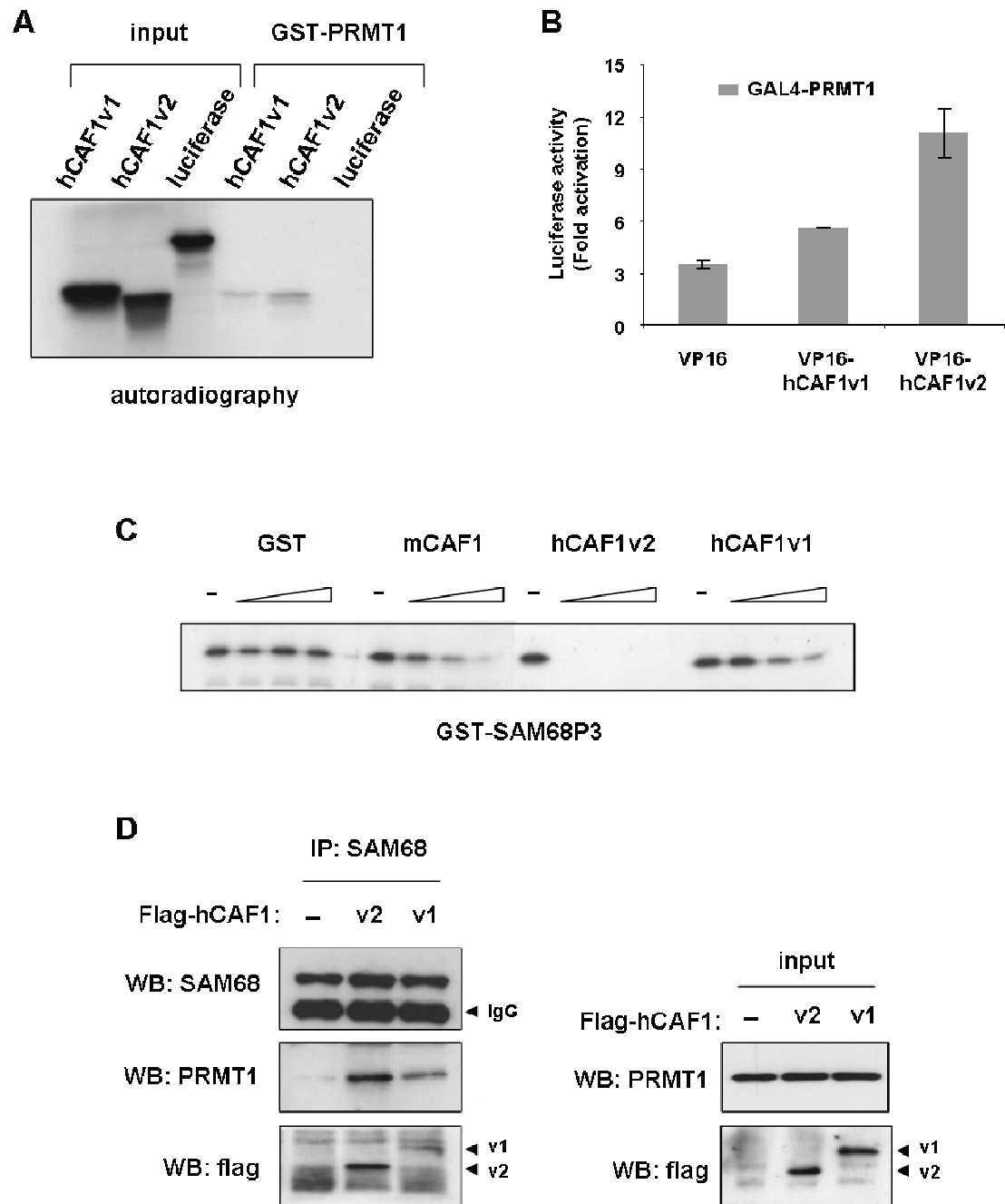
Figure 5: The hCAF1v2 proteins interact with PRMT1 and regulate arginine methylation. **(A)** Direct interaction between the hCAF1v2 protein and PRMT1 was analyzed by GST-pull-down experiments. ³⁵S-labeled *in vitro* translated hCAF1v1, hCAF1v2 and luciferase were incubated with GST-PRMT1–glutathione-Sepharose beads. The eluted proteins and 1/50 of input radiolabeled proteins were analyzed by SDS-PAGE and visualized by autoradiography. **(B)** Two-hybrid assay for *in vivo* interaction of PRMT1 with hCAF1 variants. **(C)** Effect of hCAF1 isoforms on PRMT1 enzymatic activity *in vitro*. GST-PRMT1 (1 µg) was incubated with 1 µg of GST-Sam68P3 in the presence of [³H]AdoMet without or with increasing amounts of GST-mCAF1, GST-hCAF1v1, GST-hCAF1v2 or GST for 90 minutes at 37°C. The reaction mixtures were resolved on SDS-PAGE and visualized by autoradiography. **(D)** Extracts from MCF-7 cells transfected with vectors containing hCAF1v1 or hCAF1v2 (or control vector) were immunoprecipitated using anti-Sam68 antibody, then analyzed by western blotting with the indicated antibodies.











Supplementary Information

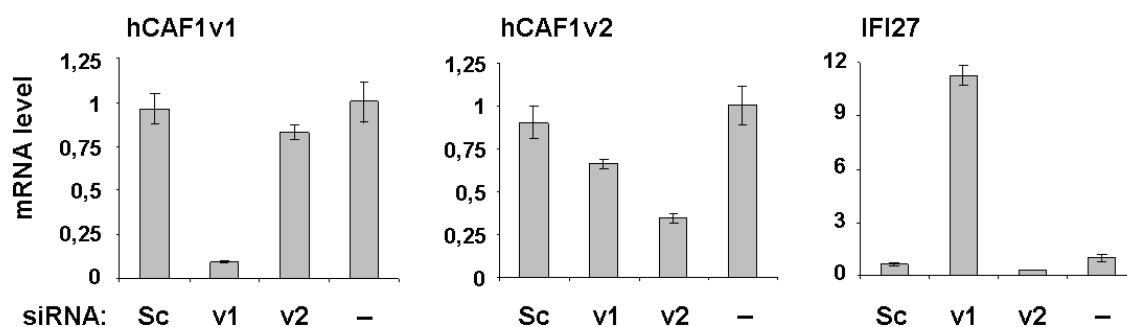
hCAF1 isoforms utilize distinct mechanisms to regulate gene expression

Clément Chapat, Thi Trang Luong, Pierre Simonet, Kamel Chettab and Laura Corbo

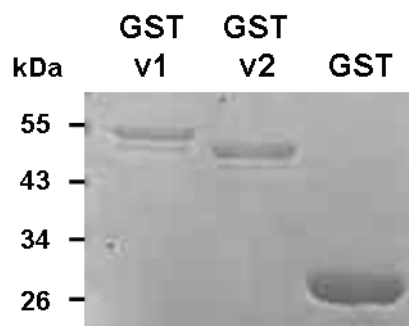
Sequences of the synthetic oligonucleotides used for real-Time PCR:

Gene	Forward	Reverse
IFI27	5' ACGGAATTAACCCGAGCAG 3'	5' GCCACAACCTCCTCCAATCAC 3'
hCAF1v1	5' GGACCTACATGACTTCTCAGG3'	5' - GACTGCTCCTTGGCTTCCTC -'3'
hCAF1v2	5' GACCGTAGCTAGCCTAATT3'	5' TCCTCCCACACTGCTTGG 3'
28S	5' GGTTGCCACTGGGGATCGAC3'	5' TCTTCTGGACTGCGCATGAG 3'
36B4	5'GTGTTCGACAATGGCAGCAT 3'	5' GACACCCTCCAGGAAGCGA 3'

Supplementary Figures



Supplementary Figure 1. MCF7 cells were transfected with control siRNA (sc) or with two siRNAs against hCAF1v1 and hCAF1v2. 72h after transfection, the cells were harvested and total RNA extracts were prepared. SYBR green real-time RT-PCR analysis was performed with primers specific for the transcripts of the indicated genes. Gene expression levels were normalized to internal controls 36B4 and shown as expression levels relative to expression levels in (sc) control cells (arbitrarily set to 1).



Supplementary Figure 2. Coomassie blue staining of 5µg of GST alone, GST-hCAF1v1 and GST-hCAF1v2.

. Chapitre 3 : Discussion des résultats et perspectives

I. CCR4-NOT, nouveau coordinateur de la voie IFN/JAK/STAT1

1) Une plateforme régulatrice de la voie JAK-STAT1

L'étude présentée dans l'article 1 a permis de faire émerger un nouveau modèle dans lequel le complexe CCR4-NOT fonctionnerait comme un répresseur de la signalisation des IFN. En effet, nos résultats indiquent que hCAF1 interagit avec la forme cytoplasmique de STAT1 et que l'invalidation de hCAF1 entraîne la présence de STAT1 sur ses promoteurs cibles en absence de stimulation par l'IFN. En parallèle de ces observations, nous avons détecté une diminution importante de la phosphorylation de STAT1 lors d'une activation de la voie par les IFN de type I et II (article 1, figures 4A et Sup. 3A). Ces données suggèrent un rôle de hCAF1 à la fois dans la répression de STAT1 en absence d'IFN, et en même temps dans son processus d'activation par les kinases associées aux récepteurs à l'IFN. Cette observation se rapproche d'une étude récente menée chez la drosophile visant à mettre en évidence de nouveaux régulateurs de STAT92E, et dans laquelle la sous-unité Not4/CNOT4 de CCR4-NOT a été identifiée comme un nouveau régulateur positive de la voie JAK/STAT (Grönholm et al., 2012). Il apparaît en effet que la surexpression de Not4/CNOT4 chez la drosophile et l'humain augmente l'activité transcriptionnelle de STAT92E et STAT1 respectivement, ceci s'accompagnant d'une interaction entre les deux protéines chez les deux espèces. Ces résultats laissent supposer que CCR4-NOT joue un rôle crucial au niveau du complexe multi-protéique formant le récepteur à l'IFN, à l'endroit même où l'activité de STAT1 est modulée. Plusieurs études ont démontré que le récepteur à l'IFN est la base d'une structure complexe qui fait l'objet d'un pré-assemblage constitutif nécessaire à l'activation de STAT1 (Krause et al., 2006a, 2006b). L'association préalable et constitutive de JAK2 et STAT1 avec le récepteur IFNGR2 est ainsi requise pour une activation optimale de STAT1 lors d'une stimulation par l'IFN γ (Krause et al., 2006a). Ces observations se rapprochent du modèle de « plateforme chaperonne » formulé par M.A. Collart (Collart and Timmers, 2004). Ce concept s'appuie sur l'ensemble des travaux décrivant le rôle du CCR4-NOT dans le recrutement et l'assemblage sur les ARNm de la machinerie de decapping et de dégradation des ARNm, mais également dans le contrôle de l'assemblage de complexes macromoléculaires tels que le protéasome. Dans son modèle, M.A. Collart suggère que l'association de CCR4-NOT avec le ribosome et les peptides naissants est à l'origine de cette activité chaperonne et que le complexe agirait tel un échafaudage facilitant l'assemblage des protéines néo-synthétisées (Collart and Panasenko, 2012). De la même façon, CCR4-NOT pourrait réguler l'intégrité du complexe formant le

récepteur à l'IFN et contrôler la fonction de STAT1 afin de permettre son activation optimale (figure 29A). Il serait donc intéressant d'analyser le rôle de hCAF1 et de CCR4-NOT dans la régulation du complexe formé autour des récepteurs IFN, d'une part dans la régulation de son pré-assemblage et son intégrité à la membrane, d'autre part dans le contrôle de la transduction du signal qui en émerge. Des expériences d'interaction seront réalisées pour étudier le rôle de CCR4-NOT dans l'assemblage des récepteurs avec les kinases JAK et le facteur STAT1. Des résultats préliminaires et non publiés obtenus récemment indiquent l'existence d'une interaction entre hCAF1 et la kinase JAK2 *via* des analyses en « Proximity Ligation Assay ». Nous avons également réalisé des analyses en immunofluorescence qui suggèrent une co-localisation partielle entre les protéines hCAF1 et JAK2 située au niveau de la membrane plasmique en absence de stimulation par l'IFN.

2) CCR4-NOT et les modifications de STAT1

Le facteur STAT1 représente le véritable effecteur de la cascade signalétique liée aux IFN. Notre étude révèle l'existence d'une interaction cytoplasmique entre hCAF1 et STAT1, et que l'invalidation de hCAF1 résulte en une activation de STAT1 de manière indépendante de sa phosphorylation. Il nous semble donc important d'étudier plus en profondeur les mécanismes moléculaires utilisés par hCAF1 pour inhiber l'activité de STAT1.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2.I.B.b, la cellule met en œuvre des mécanismes moléculaires extrêmement contrôlés afin de pouvoir réguler la réponse IFN. L'un de ces mécanismes met en jeu des modifications post-traductionnelles de STAT1, notamment l'acétylation, la sumoylation et la méthylation des arginines. En utilisant les populations cellulaires invalidées pour hCAF1 mises en place pendant ma thèse, il semble judicieux de se focaliser sur l'implication de hCAF1 dans l'orchestration des modifications de STAT1. L'équipe ayant montré que hCAF1 régule l'activité de l'arginine méthyl-transférase PRMT1, la méthylation de STAT1 s'avère être une cible pertinente. Dans ce sens, le domaine intracytoplasmique du récepteur à l'IFN de type I IFNAR a été identifié lors d'un criblage double-hybride comme un site d'ancrage pour l'enzyme PRMT1. Le groupe de M. Revel a en effet décrit PRMT1 comme un acteur essentiel à l'activation de la voie JAK/STAT1 en réponse à l'IFN (Abramovich et al., 1997; Altschuler et al., 1999). Ces données renforcent l'idée d'une implication de CCR4-NOT au niveau du complexe multi-protéique formé autour des récepteurs à l'IFN, potentiellement *via* la modulation de la méthylation de STAT1 par PRMT1.

D'autre part, nous pouvons imaginer un mécanisme dans lequel CCR4-NOT pourrait induire la polyubiquitylation de STAT1 et sa dégradation par le protéasome. Ainsi, l'inhibition de hCAF1 conduirait à la stabilisation de STAT1, lui permettant alors de transloquer dans le noyau pour activer certains de ces gènes cibles. Il serait donc intéressant d'analyser si hCAF1 est capable de réguler la stabilité de la protéine STAT1. Ceci serait d'autant plus intéressant puisque comme nous l'avons précisé précédemment, la protéine NOT4 du complexe CCR4-NOT est une E3 ubiquitine ligase. On pourrait donc imaginer un modèle dans lequel hCAF1 interagit avec STAT1, permettant le recrutement de NOT4 afin d'ubiquitiner STAT1.

3) CCR4-NOT et l'accessibilité de STAT1 à la chromatine

Nos résultats suggèrent un effet de la sous-unité hCAF1 dans le contrôle cytoplasmique de l'activité transcriptionnelle de STAT1. Dans les cellules où l'expression de hCAF1 est inhibée et en absence de traitement par les IFN, nous avons mis en évidence le recrutement constitutif de STAT1 au niveau des promoteurs de ses gènes cibles, associé à une hyperacétylation de l'histone H4 et une décondensation de la chromatine. De la levure jusqu'aux mammifères, CCR4-NOT a été impliqué dans les processus de régulation de la transcription et des modifications post-traductionnelles des histones. Dans notre étude, on ne peut exclure un rôle de hCAF1 dans le processus nucléaire de répression transcriptionnelle des gènes cibles de STAT1, soit *via* la régulation de l'environnement chromatinien modulant l'accessibilité de STAT1, soit en régulant le recrutement de complexes co-répresseurs (figure 29B). Nous avons cherché à comprendre si hCAF1 pouvait être un répresseur transcriptionnel de STAT1. Pour cela, nous avons réalisé des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) dans les cellules MCF7 au cours de cinétiques d'activation par les IFN afin de déterminer si hCAF1 était capable de se lier au promoteur de STAT1. Nous n'avons toutefois pas détecté la présence de hCAF1 sur les régions promotrices de STAT1, ce qui ne signifie pas forcément que la protéine hCAF1 n'intervient pas dans la transcription de ce gène. Il est possible que hCAF1 ne se lie pas directement au niveau de l'ADN et que dans ce cas, la technique que nous utilisons ne soit pas suffisamment résolutive pour analyser son recrutement. Nous pourrions alors d'une part étudier d'éventuelles interactions de hCAF1 avec les cofacteurs de STAT1 tels que CBP/p300, MCM5 et BRCA1 et analyser leur présence au niveau du promoteur de STAT1 lorsque hCAF1 est exprimée ou non. D'autre part, il sera intéressant d'étudier l'implication de hCAF1 dans la régulation de l'accessibilité de STAT1 à l'ADN *via* le remodelage de la chromatine au niveau de ses promoteurs cibles. Le laboratoire a décrit que

hCAF1 est un répresseur à l'échelle globale de la méthylation de l'arginine 3 de l'histone H4. Nous souhaitons donc utiliser des approches de ChIP pour analyser les profils épigénétiques au niveau des promoteurs cibles de STAT1 lors d'une stimulation par l'IFN en présence ou non de hCAF1.

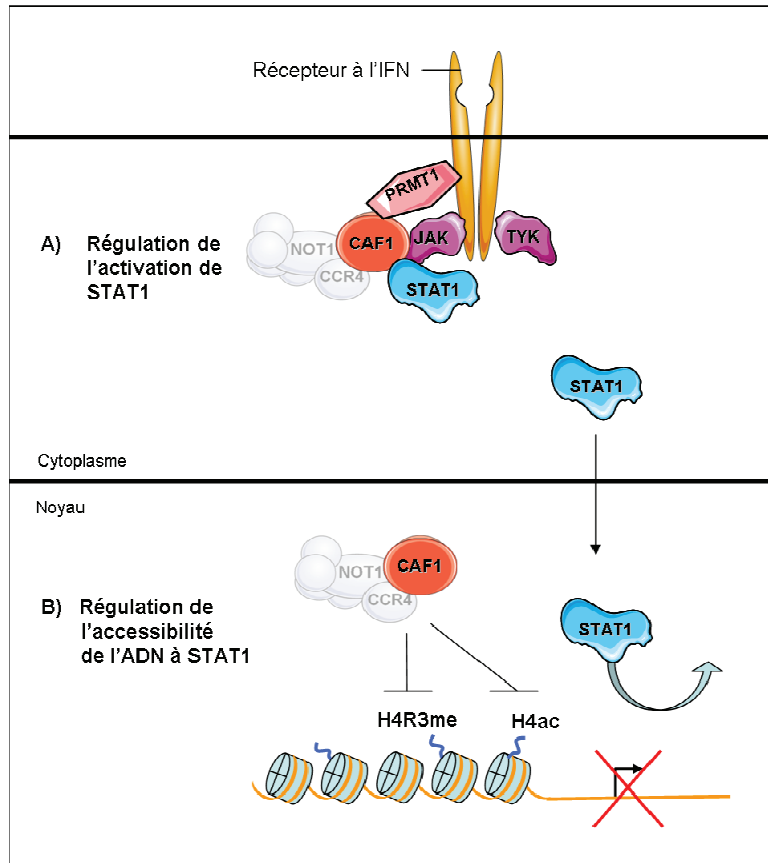


Figure 29 : Modèle de régulation de la voie JAK/STAT1 par CCR4-NOT au niveau transcriptionnel. **A)** Régulation de l'activation de STAT1 au niveau du complexe multi-protéique formant le récepteur à l'IFN. Le complexe CCR4-NOT pourrait jouer le rôle d'une plateforme chaperonne qui régule négativement le facteur STAT1 en absence d'IFN, et positivement lors d'une stimulation. Ce rôle de chaperon peut potentiellement impliquer la régulation de l'activité de PRMT1. **B)** Modèle de régulation de l'accessibilité de STAT1 sur ses promoteurs cibles. Dans certaines conditions, STAT1 non phosphorylé est capable de migrer dans le noyau. Le complexe CCR4-NOT pourrait réguler la conformation chromatinienne des promoteurs ciblés par STAT1 en agissant notamment sur la méthylation de H4 dépendante de PRMT1 et le remodelage de la chromatine.

:

4) Régulation de l'immunité innée

L'ensemble de ces données devrait fournir d'importantes indications concernant les fonctions de la protéine hCAF1 vis-à-vis de l'expression des gènes associés aux IFN et aussi, à plus grande échelle, de la régulation de l'immunité innée. Depuis quelques années, plusieurs études établies chez la drosophile et la plante *Arabidopsis thaliana* ont été publiées supposant

un lien entre la protéine CAF1 et l'expression des gènes de réponse aux infections microbiennes (Lauwers et al., 2009; Liang et al., 2009b; Sarowar et al., 2007). Dans ce contexte, la pertinence physiologique de nos résultats pourra être testée avec les souris *Caf1*^{-/-} dans lesquelles des tests d'infections virales et microbiennes seront effectués pour vérifier cette hypothèse attractive d'un lien entre CAF1 et l'immunité innée. On pourrait imaginer que l'inhibition de la protéine hCAF1 permet une meilleure résistance des souris à une infection virale ou microbienne tout comme cela a pu être observé dans des souris invalidées pour le gène *Pias1*, qui code pour une protéine inhibitrice de STAT1 (B. Liu et al., 2004).

5) Implication de hCAF1 dans la tumorigénèse

Il apparaît crucial de développer un axe de recherche consistant à analyser l'implication de hCAF1 dans les mécanismes de transformation et d'échappement tumoral. En effet, STAT1 est un suppresseur de tumeur dont la perte est fréquemment observée durant la progression des cancers mammaires. De même, les souris *Stat1*^{-/-} développent spontanément des tumeurs mammaires œstrogéno-dépendantes dont le phénotype récapitule la biologie des cancers du sein ERα⁺ chez la femme (Chan et al., 2012). Il paraît donc important de vérifier la pertinence de notre modèle dans une approche directement liée à l'oncologie mammaire, afin de contribuer au développement de nouveaux marqueurs et outils thérapeutiques pour le traitement du cancer du sein. Une étude en immunohistochimie devrait être menée sur des tumeurs mammaires issues de patientes pour lesquelles les données pronostiques (y compris le statut hormonal) et évolutives (plus de 5 ans de suivi) sont enregistrées dans une base de données. Des anomalies d'expression, voire de localisation, de hCAF1 seront recherchées dans les tumeurs mammaires humaines, et si celles-ci sont associées à une perte de fonction de STAT1 dans ces cancers. Sur ces cohortes de tumeurs, l'interaction entre hCAF1 et STAT1 pourra être analysée *in-situ* en utilisant la technique de PLA (Proximity Ligation Assay), qui permet de détecter, de localiser et de quantifier une interaction aussi dans des échantillons tumoraux inclus en paraffine. Des analyses statistiques et des corrélations seront effectuées pour relier la localisation et la quantité des complexes hCAF1/STAT1 avec le statut des tumeurs.

II. Régulation post-transcriptionnelle de la réponse IFN

1) CCR4-NOT et la stabilité des ARNm cibles de STAT1

En parallèle du rôle de hCAF1 dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de STAT1, nos résultats indiquent que l'inactivation de hCAF1 stabilise les transcrits cibles de STAT1 tels que Ifi27, Ifi6, et Ifitm1. Ainsi notre modèle implique l'existence d'un second degré de régulation de la voie des IFN par le complexe CCR4-NOT situé au niveau post-transcriptionnel. La magnitude et la durée de la réponse IFN doit être finement régulée car des activations anormales de la voie JAK/STAT sont associées à de nombreuses pathologies telles que le cancer ou les maladies immunitaires (Levy and Darnell, 2002). La cellule doit donc mettre en œuvre des mécanismes extrêmement contrôlés afin de pouvoir mettre fin à la réponse IFN. La sensibilité des ARN cibles de STAT1 à l'activité de hCAF1 suggère que la déadénylation par CCR4-NOT joue un rôle important dans l'élimination de ces ARNm et favorise l'extinction de la réponse IFN. L'un des principaux axes à développer concernerait l'étude des déterminants de la stabilité post-transcriptionnelle des ARNm cibles de STAT1. De nombreux éléments déstabilisateurs tels que les ARE ont été identifiés dans les régions 3'UTR des ARNm codants pour les cytokines et notamment les IFN. Nous avons donc menées des analyses *in silico* à partir des séquences 3'UTR des gènes cibles de STAT1 surexprimés dans les cellules hCAF1^{kd}. Cette étude n'a toutefois pas mis en évidence la présence de motifs connus dans ces ARNm, du moins pas dans leur région 3'UTR.

De manière alternative, on peut supposer l'existence d'une augmentation de l'activité déadénylase intrinsèque de hCAF1 suite à l'expression IFN-dépendante d'activateurs tels que les facteurs BTG/TOB. Des données préliminaires obtenus récemment indiquent qu'une stimulation par l'IFN des cellules Hela active l'expression des gènes *Btg1* et *Btg2*. Dans ce sens, il serait nécessaire de développer un système rapporteur permettant la quantification *in cellulo* de l'activité déadénylase intrinsèque associée à CCR4-NOT.

2) Effet de STAT1 sur le destin de ces ARNm cibles

La réponse IFN présente un caractère rapide et transitoire, défini par une forte activation transcriptionnelle, suivie d'une dégradation rapide des transcrits produits. Cette cinétique d'induction génique est caractéristique des gènes de réponse au stress évoqués dans le chapitre 1.II.A et dont l'étude a permis l'émergence du modèle de couplage synthèse/dégradation des ARNm. De manière intéressante, le seul élément partagé par tous les

gènes étudiés dans l'article 1 s'avère être le site de fixation de STAT1 dans leur promoteur. Il est par conséquent judicieux de spéculer que la stabilité des transcrits codés par ce groupe de gènes est directement sous le contrôle du promoteur et donc de STAT1. Le mécanisme d'expression des gènes cibles de STAT1 apparaît alors comme un modèle d'étude optimal pour analyser le phénomène de couplage chez l'humain. Des expériences utilisant un gène rapporteur placé sous le contrôle d'un promoteur minimal ou présentant un site de fixation pour STAT1 pourront être mises en œuvre pour mesurer en présence d'actinomycine D la demi-vie des transcrits produits par STAT1.

Cette hypothèse suggère également l'existence de marques déposées co-transcriptionnellement sous le contrôle de STAT1. Il pourrait s'agir d'une RBP coordinatrice régulant préférentiellement le recrutement de CCR4-NOT dans le cytoplasme. Dans ce sens, les protéines BTG/TOB sont des candidats idéaux puisqu'ils sont exprimés lors de stress, sont détectés au niveau des promoteurs des gènes humains et activent la déadénylation des ARNm (Doidge et al., 2012; Passeri et al., 2006). De même, on peut également imaginer un rôle de STAT1 dans la déposition co-transcriptionnelle de membres du complexe CCR4-NOT qui favoriseront la déadénylation dans le cytoplasme. Un modèle similaire a été proposé par M.A. Collart dans une revue récente, suggérant que le module NOT3/NOT5 pourrait réguler la transcription, s'associer à l'ARNm de manière co-transcriptionnelle et ainsi recruter la machinerie de déadénylation dans le cytoplasme (Collart et al., 2013).

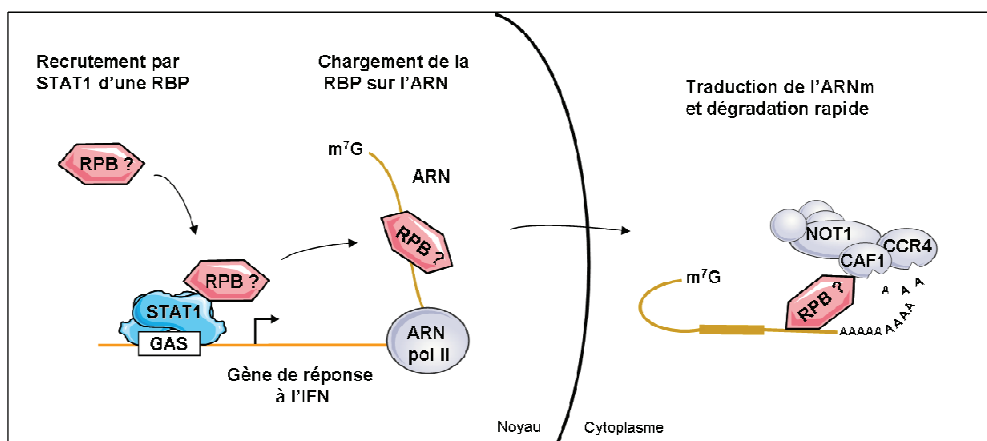


Figure 30 : Modèle de régulation de la stabilité des transcrits cibles de STAT1. La fixation de STAT1 sur ses promoteurs pourrait recruter une RBP qui en s'associant avec l'ARNm régulerait le destin cytoplasmique. Cette RBP putative pourrait permettre le recrutement du complexe CCR4-NOT sur les ARNm de réponse à l'IFN et induire leur déadénylation et leur dégradation rapide.

III. Multiplicité fonctionnelle de CCR4-NOT

En parallèle de nos travaux sur la signalisation de l'IFN, nous avons caractérisé pour la première fois l'existence d'une nouvelle protéine produite suite à l'épissage alternatif du gène humain *hCaf1* : le facteur hCAF1v2. Bien que préliminaires, nos données indiquent une divergence fonctionnelle entre les isoformes hCAF1 puisque contrairement à hCAF1v1, le variant hCAF1v2 ne possède pas d'activité déadénylase intrinsèque, est majoritairement nucléaire et semble être davantage requis pour réguler l'activité de l'enzyme PRMT1. L'existence de ces isoformes pourrait participer à l'origine de la multiplicité fonctionnelle associée à hCAF1 et au complexe CCR4-NOT.

1) hCAF1v2 et le complexe CCR4-NOT

De nombreuses études ont décrit que la sous-unité CAF1 s'associe à CNOT1 et permet de recruter CCR4, maintenant ainsi l'intégrité du module déadénylase au sein du complexe CCR4-NOT. Dans ce contexte, nous avons examiné la capacité de l'isoforme hCAF1v2 à s'associer aux protéines CNOT1 et CCR4. Les expériences de co-immunoprécipitation menées à partir de la sous-unité CNOT1, l'échafaudage structural de CCR4-NOT, suggèrent que hCAF1v2 est capable de s'associer au complexe. Néanmoins, les tests d'interaction en GST pulldown suggèrent une faible affinité de la protéine CCR4 pour hCAF1v2 en comparaison avec hCAF1v1. De par son absence d'activité déadénylase et sa faible affinité pour CCR4, l'isoforme hCAF1v2 pourrait ainsi, *via* son intégration dans le complexe CCR4-NOT, agir tel un dominant négatif vis-à-vis de la fonction de hCAF1v1 au sein du module déadénylase. Par ailleurs, nos données soulèvent la question de la coexistence dans la cellule de plusieurs complexes CCR4-NOT distincts dans leur taille, leur composition, leur localisation et leur fonction. Chez la levure comme chez les mammifères, deux complexes de tailles différentes sont détectés en chromatographie sur gel filtration, une forme de 0,9-1,2 MDa coexistant avec une version de 1,9-2 MDa (Gavin et al., 2002; Morel et al., 2003). De même, l'existence de différentes déadénylases suppose la présence de nombreuses combinaisons de CCR4-NOT dans la cellule mammifère (Lau et al., 2009). Il a en plus été décrit chez l'humain un complexe CCR4-NOT non conventionnel contenant des déadénylases spécifiques du noyau hCCR4d et hCAF1z, potentiellement impliqué dans la dégradation des ARN nucléaires aberrants (Wagner et al., 2007). De la même façon que l'existence de toutes

ces versions pourrait être à l'origine de la multiplicité fonctionnelle associée à CCR4-NOT, l'épissage alternatif du gène *hCaf1* semble être une source importante de diversification fonctionnelle.

Dans ce contexte, il apparaît essentiel d'identifier les partenaires de hCAF1v2. Il serait pertinent de mettre en place une stratégie de purification de hCAF1v2, *via* des approches de TAP-TAG (Tandem Affinity Purification) par exemple, suivie par une analyse des facteurs associées en spectrométrie de masse. Conduite de façon comparative avec hCAF1v1, cette étude devrait permettre de comprendre la fonction et la divergence des isoformes hCAF1 dans les cellules humaines.

2) Les isoformes hCAF1 et la famille BTG/TOB

Comme nous l'avons vu précédemment, les membres de la famille BTG/TOB sont des régulateurs importants de l'activité de hCAF1, notamment en permettant son recrutement sur les ARNm. Les protéines BTG/TOB possèdent des propriétés anti-prolifératrices et sont particulièrement exprimés lors de stress. De manière intéressante, leur capacité à réguler négativement la prolifération cellulaire dépend de leur association avec hCAF1 (Doidge et al., 2012). Nos données de GST pull-down et de double-hybride *in cellulo* indiquent que l'isoforme hCAF1v2 n'est pas un partenaire des protéines BTG/TOB. Cette observation suggère que les 41 résidus présents dans hCAF1v1 et absent de la séquence de hCAF1v2 sont nécessaires à l'interaction avec les facteurs BTG/TOB. L'analyse cristallographique du complexe hCAF1-TOB publiée par le groupe de T. Yamamoto et F. Inagaki confirme nos résultats (figure 31) (Horiuchi et al., 2009). Dans ce contexte, on peut imaginer qu'une modulation de l'épissage alternatif du gène *hCaf1* favorisant la production de hCAF1v2 aux dépens de hCAF1v1 pourrait court-circuiter l'activité anti-prolifératrice associée aux facteurs BTG/TOB. Il serait intéressant de tester cette hypothèse en quantifiant par RT-PCR quantitative l'expression des variants hCAF1 dans des échantillons issus de tumeurs afin d'observer d'éventuelles dérégulations de l'épissage du gène *hCaf1* dans les cancers humains. En parallèle, l'étude des effets de la transfection stable de hCAF1v2 ou hCAF1v1 dans des lignées cellulaires murines *Caf1*^{-/-} disponibles au laboratoire permettrait de mieux définir le rôle de chaque isoforme vis-à-vis de la croissance cellulaire dépendante des facteurs BTG/TOB.

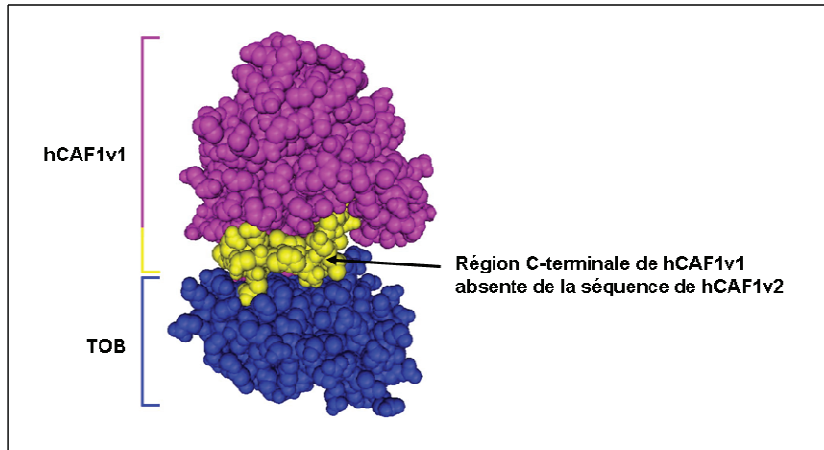


Figure 31 : Structure cristallographique du complexe hCAF1-TOB. (Daprès Horiuchi et al., 2009) Les 41 acides aminés C-terminaux de hCAF1v1 absents de hCAF1v2 sont illustrés en jaune *via* le logiciel Cn3D, indiquant leur importance dans l'interaction hCAF1v1-TOB

3) Les isoformes hCAF1 et la méthylation des arginines

Nos résultats indiquent que les isoformes hCAF1 sont capables de réguler la méthylation des arginines *via* la modulation de l'enzyme PRMT1, et que hCAF1v2 présente davantage d'affinité pour PRMT1 que hCAF1v1. Etant donnée la fonction cruciale de PRMT1 dans les processus de modifications d'histones, d'épissage et d'export des ARNm, cette association pourrait être à la base de l'implication de CAF1 et CCR4-NOT dans les mécanismes nucléaires associés à l'expression génique. L'un des principaux axes de recherches à développer désormais consiste à définir précisément comment la modulation de la méthylation des arginines par les isoformes hCAF1 est susceptible d'influencer l'expression des gènes.

(a) Implication dans l'initiation transcriptionnelle

De la même façon que nous avons proposé d'étudier le rôle de hCAF1 dans la méthylation des histones régulant l'accessibilité du facteur STAT1 sur les promoteurs activés par l'IFN, il apparaît essentiel de comprendre si les protéines hCAF1, et notamment hCAF1v2, peuvent influencer de manière générale l'activation transcriptionnelle *via* la modulation de l'activité de PRMT1. L'initiation de la transcription dépendante des récepteurs nucléaires s'avère être directement contrôlée par la méthylation de H4 sur l'arginine 3 (Barrero and Malik, 2006; Wang et al., 2001). Nous souhaitons donc réaliser des essais transcriptionnels avec des plasmides utilisant le gène de la luciférase dont l'expression est sous le contrôle d'élément de réponse à des récepteurs nucléaires, en particulier le récepteur aux oestrogènes ER α . Cette

construction sera transfectée en présence ou non des isoformes hCAF1 de façon à mesurer leur implication dans le processus transcriptionnel oestrogéno-dépendant. En parallèle, des expériences de ChIP ciblant les modifications d'histones seront réalisées sur des promoteurs de gènes régulés par ER α lors de cinétiques d'induction transcriptionnelle par les oestrogènes, en absence ou non des isoformes hCAF1. Cette approche devrait permettre de mieux cerner leur rôle dans la mise en place des profils épigénétiques nécessaires à l'initiation transcriptionnelle.

(b) Implication dans l'épissage

Les expériences d'immunomarquage réalisés préalablement au laboratoire ont démontré que hCAF1 et PRMT1 colocalisent dans des corps nucléaires appelés « splicing speckles » (Robin-Lespinasse et al., 2007). Cette localisation correspond vraisemblablement à celle obtenue dans l'article 2 lors de l'immunofluorescence de hCAF1v2. Les speckles sont des structures interchromatiniennes situées à proximité de sites de transcription hautement actifs : les fibrilles « périchromatiniennes ». Un modèle propose que ces structures soient des réservoirs de facteurs d'épissage depuis lesquels ces derniers seraient libérés vers des sites de transcription et d'épissage actifs suite à des modifications post-traductionnelles (Lamond and Spector, 2003). De ce fait, il n'est donc pas illogique de penser que la méthylation des arginines puisse intervenir dans la régulation de ce phénomène, d'autant plus que divers substrats de PRMT1 semblent être impliqués dans la régulation de l'épissage alternatif, tels que les facteurs hnRNP et SAM68. Dans ce sens, nous avons mis en évidence que les protéines hCAF1, particulièrement l'isoforme hCAF1v2, s'associent avec SAM68 et régulent sa méthylation par PRMT1. SAM68, protéine nucléaire appartenant à la famille des STAR (Signal Transduction and Activation RNA), est impliquée dans divers processus liés à l'ARN et notamment dans la régulation de l'épissage alternatif de façon dépendante de sa méthylation (Paronetto et al., 2007; Rajan et al., 2008). Ainsi ces résultats obtenus sur la régulation par hCAF1 de la méthylation PRMT1-dépendante de Sam68, permettent de proposer un modèle dans lequel cette méthylation serait impliquée dans le rôle de hCAF1 dans l'épissage. Il serait donc intéressant d'étudier l'implication des protéines hCAF1 dans la régulation de ce processus, d'autant plus que le groupe de M. Timmers a déjà rapporté l'association de hCAF1 avec de nombreux facteurs d'épissage en spectrométrie de masse. (Lau et al., 2009)

De façon intéressante, nous avons d'ores et déjà pu observer dans l'équipe, par des expériences d'immunofluorescence, que l'inhibition transitoire de hCAF1v2 conduisait à une délocalisation de Sam68 qui devient alors majoritairement cytoplasmique. Nous souhaitons désormais étudier ses effets sur un minigène rapporteur CD44 placé sous le contrôle d'un promoteur minimal. Cette construction consiste à l'insertion de deux exons variables du gène humain CD44, v4 et v5 (avec leurs séquences introniques environnantes), dans un exon stable de la β -globine. La transcription de ce minigène produit alors par épissage alternatif des ARN de différentes tailles facilement analysables par RT-PCR. On retrouve ainsi deux formes majeures, l'une contenant les deux exons (inclusion), l'autre aucun exon (exclusion) et une forme minoritaire contenant un des deux exons variables. Après cotransfection dans des cellules HeLa de ce minigène rapporteur avec les vecteurs d'expression codant pour les isoformes hCAF1, les différents produits d'épissage peuvent être analysés par RT-PCR et migration sur gel d'agarose puis quantifiés pour obtenir un ratio inclusion/exclusion. Ce test devrait permettre dans un premier temps de tester l'existence du rôle de hCAF1 dans l'épissage. Par la suite, ces résultats pourront être confirmés *via* des RT-PCR quantitatives sur les gènes dont l'épissage est directement sous le contrôle de SAM68 tels que *Bcl-X* (Paronetto et al., 2007).

4) hCAF1 et le couplage synthèse/maturation des ARNm

Comme il l'a été mentionné lors des rappels bibliographiques, les processus de transcription et de maturation des ARN ne sont pas des événements séquentiels mais sont des processus concomitants. Deux modèles non exclusifs et compatibles ont été proposés pour comprendre les mécanismes qui interviennent dans ce couplage. D'une part, certains facteurs de transcription spécifiquement recrutés au niveau des régions promotrices vont intervenir durant toute l'élongation de la transcription et vont à ce moment là interagir avec divers facteurs de maturation des ARNm. Ces interactions vont alors moduler le devenir du futur transcrit et en particulier influencer l'épissage du transcrit produit (Cramer et al., 1997). D'autre part, la vitesse d'élongation de la polymérase peut affecter le choix du site d'épissage (Kadener et al., 2001; Nogues et al., 2002). Or nous avons pu constater que les protéines hCAF1 *via* la régulation de la méthylation des arginines peuvent potentiellement intervenir à la fois dans la régulation de la transcription mais également dans la régulation de l'épissage alternatif. Etant donné le rôle de hCAF1 dans la régulation de la méthylation de l'arginine 3 de l'histone H4, il serait particulièrement intéressant de comprendre si les protéines hCAF1 sont capables de

réguler l'épissage alternatif *via* la modulation de la vitesse d'élongation de la polymérase ou *via* des modifications de la chromatine.

Un modèle de couplage synthèse/maturation a été proposé pour le coactivateur transcriptionnel thermogénique PGC-1. Ce co-facteur transcriptionnel, cible de PRMT1, s'avère être transféré sur le complexe d'élongation et requis pour le bon déroulement de la maturation permettant l'assemblage du spliceosome et serait enfin exporté vers le cytoplasme avec les ARNm (Monsalve et al., 2000; Teyssier et al., 2005). Les protéines hCAF1 pourraient de la même façon s'associer aux ARN lors de leur élongation pour réguler l'épissage et la maturation, puis rester dans la particule mRNP pour réguler l'export et induire ou non leur dégradation dans le cytoplasme en fonction de l'isoforme hCAF1 associé. Cette hypothèse est corroborée par de récents travaux chez la levure qui ont mis en évidence une implication du complexe CCR4-NOT dans la régulation de l'élongation de la transcription, puis du transport et de l'export des ARNm vers le cytoplasme (Kerr et al., 2011; Kruk et al., 2011). Ce modèle de couplage synthèse/maturation vient renforcer le concept de coordination existant entre la transcription et la dégradation des ARNm, suggérant un nouveau modèle d'expression des gènes eucaryotes dans lequel toutes les étapes sont couplées les unes aux autres et où les protéines hCAF1 et le complexe CCR4-NOT semblent jouer un rôle important.

. Conclusion générale

A la fois machinerie de synthèse, de maturation et de dégradation des ARNm, plateforme chaperonne et acteur du contrôle qualité des protéines, le complexe CCR4-NOT a été défini par J. C. Reese dans une revue récente comme le « *control freak* » de la cellule eucaryote. Ce terme issu du langage psychiatrique désigne habituellement un individu anxieux et maniaque, désireux de toujours tout contrôler dans son entourage. Dans ce contexte, il paraît difficile de dessiner une image claire du rôle de CCR4-NOT dans le contrôle de l'expression génique tant il s'avère impliqué à tous les niveaux de l'expression d'un gène. Mon travail de thèse m'a permis d'explorer et d'étudier directement cette multiplicité fonctionnelle dans les cellules humaines.

L'ensemble des résultats obtenus permettent de définir les protéines hCAF1 et le complexe CCR4-NOT comme des acteurs cruciaux de l'expression génique, via leur intégration à différents niveaux du cycle de régulation des ARNm eucaryotes. D'une part, les travaux présentés ont permis d'identifier le rôle essentiel du complexe CCR4-NOT dans le contrôle et la coordination de la voie IFN/STAT1. De façon innovante, cette voie pourra être utilisée comme un nouveau modèle d'étude pour explorer et disséquer la multiplicité fonctionnelle de CCR4-NOT dans les cellules humaines. Ce résultat est d'autant plus important que des dérégulations de la voie IFN/STAT1 sont observées dans de nombreuses pathologies telles que le cancer et les maladies immunitaires. D'autre part, nos recherches ont révélé que l'épissage alternatif du gène humain *hCaf1* génère deux isoformes présentant une divergence fonctionnelle au niveau de l'activité déadénylase, de la localisation sub-cellulaire et de la méthylation des arginines. Ces résultats définissent un nouveau niveau de complexité associé aux fonctions du complexe CCR4-NOT.

L'ensemble de ce travail aura contribué à améliorer nos connaissances de ce complexe et devrait participer à la construction d'un nouveau modèle unifié de la régulation génique, dans lequel CCR4-NOT coordonne l'ensemble des étapes du processus d'expression, et intégrant les nouveaux concepts de couplage entre synthèse, maturation et dégradation des ARNm.

. Bibliographie

- Abramovich, C., Yakobson, B., Chebath, J., Revel, M., 1997. A protein-arginine methyltransferase binds to the intracytoplasmic domain of the IFNAR1 chain in the type I interferon receptor. *Embo J.* 16, 260–266.
- Adamson, T.E., Shutt, D.C., Price, D.H., 2005. Functional coupling of cleavage and polyadenylation with transcription of mRNA. *J. Biol. Chem.* 280, 32262–32271.
- Aitken, C.E., Lorsch, J.R., 2012. A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 568–576.
- Albert, T.K., Hanzawa, H., Legtenberg, Y.I.A., de Ruwe, M.J., van den Heuvel, F.A.J., Collart, M.A., Boelens, R., Timmers, H.T.M., 2002a. Identification of a ubiquitin-protein ligase subunit within the CCR4-NOT transcription repressor complex. *Embo J.* 21, 355–364.
- Albert, T.K., Hanzawa, H., Legtenberg, Y.I.A., de Ruwe, M.J., van den Heuvel, F.A.J., Collart, M.A., Boelens, R., Timmers, H.T.M., 2002b. Identification of a ubiquitin-protein ligase subunit within the CCR4-NOT transcription repressor complex. *Embo J.* 21, 355–364.
- Albert, T.K., Lemaire, M., Berkum, N.L. van, Gentz, R., Collart, M.A., Timmers, H.T.M., 2000. Isolation and characterization of human orthologs of yeast CCR4-NOT complex subunits. *Nucleic Acids Res.* 28, 809.
- Alexander, W.S., Hilton, D.J., 2004. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 503–529.
- Altschuler, L., Wook, J.O., Gurari, D., Chebath, J., Revel, M., 1999. Involvement of receptor-bound protein methyltransferase PRMT1 in antiviral and antiproliferative effects of type I interferons. *J. Interf. Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interf. Cytokine Res.* 19, 189–195.
- Anderson, J.S., Parker, R.P., 1998. The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *Embo J.* 17, 1497–1506.
- Anderson, P., Kedersha, N., 2009. RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 430–436.
- Andrei, M.A., Ingelfinger, D., Heintzmann, R., Achsel, T., Rivera-Pomar, R., Lührmann, R., 2005. A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. *Rna New York N* 11, 717–727.
- Ank, N., West, H., Bartholdy, C., Eriksson, K., Thomsen, A.R., Paludan, S.R., 2006. Lambda interferon (IFN-lambda), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo. *J. Virol.* 80, 4501–4509.
- Antunes, F., Marg, A., Vinkemeier, U., 2011. STAT1 signaling is not regulated by a phosphorylation-acetylation switch. *Mol. Cell. Biol.* 31, 3029–3037.
- Armache, K.-J., Mitterweger, S., Meinhart, A., Cramer, P., 2005. Structures of complete RNA polymerase II and its subcomplex, Rpb4/7. *J. Biol. Chem.* 280, 7131–7134.
- Aslam, A., Mittal, S., Koch, F., Andrau, J.-C., Winkler, G.S., 2009. The Ccr4-NOT deadenylase subunits CNOT7 and CNOT8 have overlapping roles and modulate cell proliferation. *Mol. Biol. Cell* 20, 3840–3850.
- Assenholt, J., Mouaikel, J., Saguez, C., Rougemaille, M., Libri, D., Jensen, T.H., 2011a. Implication of Ccr4-Not complex function in mRNA quality control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Rna New York N* 17, 1788–1794.

- Assenholt, J., Mouaikel, J., Saguez, C., Rougemaille, M., Libri, D., Jensen, T.H., 2011b. Implication of Ccr4-Not complex function in mRNA quality control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Rna* New York N 17, 1788–1794.
- Aufsatz, W., Mette, M.F., van der Winden, J., Matzke, A.J.M., Matzke, M., 2002. RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 Suppl 4, 16499–16506.
- Azzouz, N., Panasenko, O.O., Colau, G., Collart, M.A., 2009a. The CCR4-NOT complex physically and functionally interacts with TRAMP and the nuclear exosome. *Plos One* 4, e6760.
- Azzouz, N., Panasenko, O.O., Deluen, C., Hsieh, J., Theiler, G., Collart, M.A., 2009b. Specific roles for the Ccr4-Not complex subunits in expression of the genome. *Rna* New York N 15, 377–383.
- Badis, G., Saveanu, C., Fromont-Racine, M., Jacquier, A., 2004. Targeted mRNA degradation by deadenylation-independent decapping. *Mol. Cell* 15, 5–15.
- Bai, Y., Salvatore, C., Chiang, Y.C., Collart, M.A., Liu, H.Y., Denis, C.L., 1999a. The CCR4 and CAF1 proteins of the CCR4-NOT complex are physically and functionally separated from NOT2, NOT4, and NOT5. *Mol. Cell. Biol.* 19, 6642–6651.
- Bai, Y., Salvatore, C., Chiang, Y.C., Collart, M.A., Liu, H.Y., Denis, C.L., 1999b. The CCR4 and CAF1 proteins of the CCR4-NOT complex are physically and functionally separated from NOT2, NOT4, and NOT5. *Mol. Cell. Biol.* 19, 6642–6651.
- Bannister, A.J., Kouzarides, T., 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21, 381–395.
- Barrero, M.J., Malik, S., 2006. Two Functional Modes of a Nuclear Receptor-Recruited Arginine Methyltransferase in Transcriptional Activation. *Mol. Cell* 24, 233–243.
- Bartel, D.P., 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215–233.
- Basquin, J., Roudko, V.V., Rode, M., Basquin, C., Séraphin, B., Conti, E., 2012. Architecture of the Nuclease Module of the Yeast Ccr4-Not Complex: the Not1-Caf1-Ccr4 Interaction. *Mol. Cell.*
- Bassett, A., Cooper, S., Wu, C., Travers, A., 2009. The folding and unfolding of eukaryotic chromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19, 159–165.
- Basyuk, E., Suavet, F., Doglio, A., Bordonné, R., Bertrand, E., 2003. Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucleic Acids Res.* 31, 6593–6597.
- Battle, T.E., Lynch, R.A., Frank, D.A., 2006. Signal transducer and activator of transcription 1 activation in endothelial cells is a negative regulator of angiogenesis. *Cancer Res.* 66, 3649–3657.
- Bawankar, P., Loh, B., Wohlbold, L., Schmidt, S., Izaurralde, E., 2013. NOT10 and C2orf29/NOT11 form a conserved module of the CCR4-NOT complex that docks onto the NOT1 N-terminal domain. *Rna Biol.* 10, 228–244.
- Beato, M., Eisfeld, K., 1997. Transcription factor access to chromatin. *Nucleic Acids Res.* 25, 3559–3563.
- Beaudet, A.L., Caskey, C.T., 1971. Mammalian peptide chain termination. II. Codon specificity and GTPase activity of release factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 68, 619–624.
- Bedford, M.T., Clarke, S.G., 2009. Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol. Cell* 33, 1–13.
- Bedford, M.T., Richard, S., 2005. Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol. Cell* 18, 263–272.

- Beelman, C.A., Stevens, A., Caponigro, G., LaGrande, T.E., Hatfield, L., Fortner, D.M., Parker, R., 1996. An essential component of the decapping enzyme required for normal rates of mRNA turnover. *Nature* 382, 642–646.
- Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P., Izaurralde, E., 2006. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.* 20, 1885–1898.
- Beltran, M., Puig, I., Peña, C., García, J.M., Alvarez, A.B., Peña, R., Bonilla, F., de Herreros, A.G., 2008. A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Genes Dev.* 22, 756–769.
- Benoit, B., Mitou, G., Chartier, A., Temme, C., Zaessinger, S., Wahle, E., Busseau, I., Simonelig, M., 2005. An essential cytoplasmic function for the nuclear poly(A) binding protein, PABP2, in poly(A) tail length control and early development in *Drosophila*. *Dev. Cell* 9, 511–522.
- Benson, J.D., Benson, M., Howley, P.M., Struhl, K., 1998. Association of distinct yeast Not2 functional domains with components of Gcn5 histone acetylase and Ccr4 transcriptional regulatory complexes. *Embo J.* 17, 6714–6722.
- Berger, S.L., 2007. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447, 407–412.
- Bernardi, R., Pandolfi, P.P., 2007. Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 1006–1016.
- Berthet, C., Guéhenneux, F., Revol, V., Samarut, C., Lukaszewicz, A., Dehay, C., Dumontet, C., Magaud, J.-P., Rouault, J.-P., 2002. Interaction of PRMT1 with BTG/TOB proteins in cell signalling: molecular analysis and functional aspects. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 7, 29–39.
- Berthet, C., Morera, A.-M., Asensio, M.-J., Chauvin, M.-A., Morel, A.-P., Dijoud, F., Magaud, J.-P., Durand, P., Rouault, J.-P., 2004. CCR4-associated factor CAF1 is an essential factor for spermatogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 24, 5808–5820.
- Bertrand, E., Chartrand, P., Schaefer, M., Shenoy, S.M., Singer, R.H., Long, R.M., 1998. Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast. *Mol. Cell* 2, 437–445.
- Bessman, M.J., Frick, D.N., O’Handley, S.F., 1996. The MutT proteins or “Nudix” hydrolases, a family of versatile, widely distributed, “housecleaning” enzymes. *J. Biol. Chem.* 271, 25059–25062.
- Bhattacharyya, S.N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E.I., Filipowicz, W., 2006. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* 125, 1111–1124.
- Bhaumik, S.R., 2011. Distinct regulatory mechanisms of eukaryotic transcriptional activation by SAGA and TFIID. *Biochim. Biophys. Acta Bba - Gene Regul. Mech.* 1809, 97–108.
- Bianchin, C., Mauxion, F., Sentis, S., Séraphin, B., Corbo, L., 2005. Conservation of the deadenylase activity of proteins of the Caf1 family in human. *Rna New York N* 11, 487–494.
- Binari, R., Perrimon, N., 1994. Stripe-specific regulation of pair-rule genes by hopscotch, a putative Jak family tyrosine kinase in *Drosophila*. *Genes Dev.* 8, 300–312.
- Binder, R., Horowitz, J.A., Basilion, J.P., Koeller, D.M., Klausner, R.D., Harford, J.B., 1994. Evidence that the pathway of transferrin receptor mRNA degradation involves an endonucleolytic cleavage within the 3’ UTR and does not involve poly(A) tail shortening. *Embo J.* 13, 1969–1980.
- Biswas, D., Yu, Y., Mitra, D., Stillman, D.J., 2006. Genetic interactions between Nhp6 and Gcn5 with Mot1 and the Ccr4-Not complex that regulate binding of TATA-binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 172, 837–849.

- Black, D.L., 2003. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 291–336.
- Boeck, R., Tarun, S., Jr, Rieger, M., Deardorff, J.A., Müller-Auer, S., Sachs, A.B., 1996. The yeast Pan2 protein is required for poly(A)-binding protein-stimulated poly(A)-nuclease activity. *J. Biol. Chem.* 271, 432–438.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., Howard, J.C., 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 749–795.
- Boisvert, F.-M., Déry, U., Masson, J.-Y., Richard, S., 2005a. Arginine methylation of MRE11 by PRMT1 is required for DNA damage checkpoint control. *Genes Dev.* 19, 671–676.
- Boisvert, F.-M., Rhie, A., Richard, S., Doherty, A.J., 2005b. The GAR motif of 53BP1 is arginine methylated by PRMT1 and is necessary for 53BP1 DNA binding activity. *Cell Cycle Georget. Tex* 4, 1834–1841.
- Boisvert, F.-M., van Koningsbruggen, S., Navascués, J., Lamond, A.I., 2007. The multifunctional nucleolus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 574–585.
- Borden, E.C., Sen, G.C., Uze, G., Silverman, R.H., Ransohoff, R.M., Foster, G.R., Stark, G.R., 2007. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 975–990.
- Bousquet-Antonelli, C., Presutti, C., Tollervey, D., 2000. Identification of a regulated pathway for nuclear pre-mRNA turnover. *Cell* 102, 765–775.
- Bregman, A., Avraham-Kelbert, M., Barkai, O., Duek, L., Guterman, A., Choder, M., 2011. Promoter elements regulate cytoplasmic mRNA decay. *Cell* 147, 1473–1483.
- Bremer, K.A., Stevens, A., Schoenberg, D.R., 2003. An endonuclease activity similar to *Xenopus* PMR1 catalyzes the degradation of normal and nonsense-containing human beta-globin mRNA in erythroid cells. *Rna New York N* 9, 1157–1167.
- Bregues, M., Teixeira, D., Parker, R., 2005. Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* 310, 486–489.
- Brennecke, J., Aravin, A.A., Stark, A., Dus, M., Kellis, M., Sachidanandam, R., Hannon, G.J., 2007. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell* 128, 1089–1103.
- Briata, P., Forcales, S.V., Ponassi, M., Corte, G., Chen, C.-Y., Karin, M., Puri, P.L., Gherzi, R., 2005. p38-dependent phosphorylation of the mRNA decay-promoting factor KSRP controls the stability of select myogenic transcripts. *Mol. Cell* 20, 891–903.
- Bromberg, J., Darnell, J.E., Jr, 2000. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 19, 2468–2473.
- Brooks, S.A., Blackshear, P.J., 2013. Tristetraprolin (TTP): Interactions with mRNA and proteins, and current thoughts on mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta*.
- Brower-Toland, B., Findley, S.D., Jiang, L., Liu, L., Yin, H., Dus, M., Zhou, P., Elgin, S.C.R., Lin, H., 2007. *Drosophila* PIWI associates with chromatin and interacts directly with HP1a. *Genes Dev.* 21, 2300–2311.
- Brown, C.E., Tarun, S.Z., Jr, Boeck, R., Sachs, A.B., 1996. PAN3 encodes a subunit of the Pab1p-dependent poly(A) nuclease in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 16, 5744–5753.
- Brown, J.T., Bai, X., Johnson, A.W., 2000. The yeast antiviral proteins Ski2p, Ski3p, and Ski8p exist as a complex in vivo. *Rna New York N* 6, 449–457.
- Buchan, J.R., Parker, R., 2009. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol. Cell* 36, 932–941.
- Caput, D., Beutler, B., Hartog, K., Thayer, R., Brown-Shimer, S., Cerami, A., 1986. Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 1670–1674.

- Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M.C., et al., 2005. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 309, 1559–1563.
- Castel, S.E., Martienssen, R.A., 2013. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 14, 100–112.
- Castello, A., Fischer, B., Eichelbaum, K., Horos, R., Beckmann, B.M., Strein, C., Davey, N.E., Humphreys, D.T., Preiss, T., Steinmetz, L.M., Krijgsvel, J., Hentze, M.W., 2012. Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. *Cell* 149, 1393–1406.
- Cha, B., Kim, W., Kim, Y.K., Hwang, B.N., Park, S.Y., Yoon, J.W., Park, W.S., Cho, J.W., Bedford, M.T., Jho, E., 2011. Methylation by protein arginine methyltransferase 1 increases stability of Axin, a negative regulator of Wnt signaling. *Oncogene* 30, 2379–2389.
- Chan, S.R., Vermi, W., Luo, J., Lucini, L., Rickert, C., Fowler, A.M., Lonardi, S., Arthur, C., Young, L.J., Levy, D.E., Welch, M.J., Cardiff, R.D., Schreiber, R.D., 2012. STAT1-deficient mice spontaneously develop estrogen receptor α -positive luminal mammary carcinomas. *Breast Cancer Res. Bcr* 14, R16.
- Chang, M., French-Cornay, D., Fan, H.Y., Klein, H., Denis, C.L., Jaehning, J.A., 1999. A complex containing RNA polymerase II, Paf1p, Cdc73p, Hpr1p, and Ccr4p plays a role in protein kinase C signaling. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1056–1067.
- Chang, M., Jaehning, J.A., 1997. A multiplicity of mediators: alternative forms of transcription complexes communicate with transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res.* 25, 4861–4865.
- Chang, Y.-I., Hsu, S.-C., Chau, G.-Y., Huang, C.-Y.F., Sung, J.-S., Hua, W.-K., Lin, W.-J., 2011. Identification of the methylation preference region in heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K by protein arginine methyltransferase 1 and its implication in regulating nuclear/cytoplasmic distribution. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404, 865–869.
- Chatterjee-Kishore, M., Wright, K.L., Ting, J.P., Stark, G.R., 2000. How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *Embo J.* 19, 4111–4122.
- Cheadle, C., Fan, J., Cho-Chung, Y.S., Werner, T., Ray, J., Do, L., Gorospe, M., Becker, K.G., 2005. Control of gene expression during T cell activation: alternate regulation of mRNA transcription and mRNA stability. *Bmc Genomics* 6, 75.
- Chen, H.-W., Chen, X., Oh, S.-W., Marinissen, M.J., Gutkind, J.S., Hou, S.X., 2002. mom identifies a receptor for the Drosophila JAK/STAT signal transduction pathway and encodes a protein distantly related to the mammalian cytokine receptor family. *Genes Dev.* 16, 388–398.
- Chen, J., Chiang, Y.-C., Denis, C.L., 2002a. CCR4, a 3'-5' poly(A) RNA and ssDNA exonuclease, is the catalytic component of the cytoplasmic deadenylase. *Embo J.* 21, 1414–1426.
- Chen, J., Chiang, Y.-C., Denis, C.L., 2002b. CCR4, a 3'-5' poly(A) RNA and ssDNA exonuclease, is the catalytic component of the cytoplasmic deadenylase. *Embo J.* 21, 1414–1426.
- Chendrimada, T.P., Finn, K.J., Ji, X., Baillat, D., Gregory, R.I., Liebhaber, S.A., Pasquinelli, A.E., Shiekhattar, R., 2007. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* 447, 823–828.
- Cheon, H., Stark, G.R., 2009. Unphosphorylated STAT1 prolongs the expression of interferon-induced immune regulatory genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 9373–9378.

- Chernokalskaya, E., Dubell, A.N., Cunningham, K.S., Hanson, M.N., Dompenciel, R.E., Schoenberg, D.R., 1998. A polysomal ribonuclease involved in the destabilization of albumin mRNA is a novel member of the peroxidase gene family. *Rna New York N* 4, 1537–1548.
- Chiba, Y., Johnson, M.A., Lidder, P., Vogel, J.T., van Erp, H., Green, P.J., 2004. AtPARN is an essential poly(A) ribonuclease in Arabidopsis. *Gene* 328, 95–102.
- Chicoine, J., Benoit, P., Gamberi, C., Paliouras, M., Simonelig, M., Lasko, P., 2007. Bicaudal-C recruits CCR4-NOT deadenylase to target mRNAs and regulates oogenesis, cytoskeletal organization, and its own expression. *Dev. Cell* 13, 691–704.
- Chin, Y.E., Kitagawa, M., Su, W.C., You, Z.H., Iwamoto, Y., Fu, X.Y., 1996. Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science* 272, 719–722.
- Cho, E.J., Takagi, T., Moore, C.R., Buratowski, S., 1997. mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev.* 11, 3319–3326.
- Cho, H., Kim, T.K., Mancebo, H., Lane, W.S., Flores, O., Reinberg, D., 1999. A protein phosphatase functions to recycle RNA polymerase II. *Genes Dev.* 13, 1540–1552.
- Choder, M., 2004. Rpb4 and Rpb7: subunits of RNA polymerase II and beyond. *Trends Biochem. Sci.* 29, 674–681.
- Choder, M., 2011. mRNA imprinting: Additional level in the regulation of gene expression. *Cell. Logist.* 1, 37–40.
- Cioce, M., Lamond, A.I., 2005. CAJAL BODIES: A Long History of Discovery. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 105–131.
- Colgan, D.F., Manley, J.L., 1997. Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev.* 11, 2755–2766.
- Collart, M.A., 1996. The NOT, SPT3, and MOT1 genes functionally interact to regulate transcription at core promoters. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6668–6676.
- Collart, M.A., Panasenko, O.O., 2012. The Ccr4--not complex. *Gene* 492, 42–53.
- Collart, M.A., Panasenko, O.O., Nikolaev, S.I., 2013. The Not3/5 subunit of the Ccr4-Not complex: a central regulator of gene expression that integrates signals between the cytoplasm and the nucleus in eukaryotic cells. *Cell. Signal.* 25, 743–751.
- Collart, M.A., Struhl, K., 1994. NOT1(CDC39), NOT2(CDC36), NOT3, and NOT4 encode a global-negative regulator of transcription that differentially affects TATA-element utilization. *Genes Dev.* 8, 525–537.
- Collart, M.A., Timmers, H.T.M., 2004. The eukaryotic Ccr4-not complex: a regulatory platform integrating mRNA metabolism with cellular signaling pathways? *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 77, 289–322.
- Coller, J., Parker, R., 2005. General translational repression by activators of mRNA decapping. *Cell* 122, 875–886.
- Colmenares, S.U., Buker, S.M., Buhler, M., Dlakić, M., Moazed, D., 2007. Coupling of double-stranded RNA synthesis and siRNA generation in fission yeast RNAi. *Mol. Cell* 27, 449–461.
- Cooke, A., Prigge, A., Wickens, M., 2010. Translational repression by deadenylases. *J. Biol. Chem.* 285, 28506–28513.
- Côté, J., Boisvert, F.-M., Boulanger, M.-C., Bedford, M.T., Richard, S., 2003. Sam68 RNA binding protein is an in vivo substrate for protein arginine N-methyltransferase 1. *Mol. Biol. Cell* 14, 274–287.
- Cougot, N., Babajko, S., Séraphin, B., 2004. Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J. Cell Biol.* 165, 31–40.

- Cramer, P., Armache, K.-J., Baumli, S., Benkert, S., Brueckner, F., Buchen, C., Damsma, G.E., Dengl, S., Geiger, S.R., Jasiak, A.J., Jawhari, A., Jennebach, S., Kamenski, T., Kettenberger, H., Kuhn, C.-D., Lehmann, E., Leike, K., Sydow, J.F., Vannini, A., 2008. Structure of eukaryotic RNA polymerases. *Annu. Rev. Biophys.* 37, 337–352.
- Cramer, P., Pesce, C.G., Baralle, F.E., Kornblihtt, A.R., 1997. Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 11456–11460.
- Cui, Y., Ramnarain, D.B., Chiang, Y.-C., Ding, L.-H., McMahon, J.S., Denis, C.L., 2008. Genome wide expression analysis of the CCR4-NOT complex indicates that it consists of three modules with the NOT module controlling SAGA-responsive genes. *Mol. Genet. Genomics* 279, 323–337.
- Cunningham, K.S., Dodson, R.E., Nagel, M.A., Shapiro, D.J., Schoenberg, D.R., 2000. Vigilin binding selectively inhibits cleavage of the vitellogenin mRNA 3'-untranslated region by the mRNA endonuclease polysomal ribonuclease 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 12498–12502.
- Dahmus, M.E., 1996. Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 271, 19009–19012.
- Dang, Y., Kedersha, N., Low, W.-K., Romo, D., Gorospe, M., Kaufman, R., Anderson, P., Liu, J.O., 2006. Eukaryotic initiation factor 2 α -independent pathway of stress granule induction by the natural product pateamine A. *J. Biol. Chem.* 281, 32870–32878.
- Das, B., Butler, J.S., Sherman, F., 2003. Degradation of normal mRNA in the nucleus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 23, 5502–5515.
- Das, B., Das, S., Sherman, F., 2006. Mutant LYS2 mRNAs retained and degraded in the nucleus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 10871–10876.
- Daugeron, M.C., Mauxion, F., Séraphin, B., 2001. The yeast POP2 gene encodes a nuclease involved in mRNA deadenylation. *Nucleic Acids Res.* 29, 2448–2455.
- De Barros Lopes, M., Ho, J.Y., Reed, S.I., 1990. Mutations in cell division cycle genes CDC36 and CDC39 activate the *Saccharomyces cerevisiae* mating pheromone response pathway. *Mol. Cell. Biol.* 10, 2966–2972.
- De Leeuw, F., Zhang, T., Wauquier, C., Huez, G., Kruys, V., Gueydan, C., 2007. The cold-inducible RNA-binding protein migrates from the nucleus to cytoplasmic stress granules by a methylation-dependent mechanism and acts as a translational repressor. *Exp. Cell Res.* 313, 4130–4144.
- Decker, C.J., Parker, R., 1993. A turnover pathway for both stable and unstable mRNAs in yeast: evidence for a requirement for deadenylation. *Genes Dev.* 7, 1632–1643.
- Decker, C.J., Teixeira, D., Parker, R., 2007. Edc3p and a glutamine/asparagine-rich domain of Lsm4p function in processing body assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 179, 437–449.
- Dehlin, E., Wormington, M., Körner, C.G., Wahle, E., 2000. Cap-dependent deadenylation of mRNA. *Embo J.* 19, 1079–1086.
- Deluen, C., James, N., Maillet, L., Molinete, M., Theiler, G., Lemaire, M., Paquet, N., Collart, M.A., 2002. The Ccr4-not complex and yTAF1 (yTaf(II)130p/yTaf(II)145p) show physical and functional interactions. *Mol. Cell. Biol.* 22, 6735–6749.
- Denis, C.L., 1984. Identification of new genes involved in the regulation of yeast alcohol dehydrogenase II. *Genetics* 108, 833–844.
- Denis, C.L., Chiang, Y.C., Cui, Y., Chen, J., 2001. Genetic evidence supports a role for the yeast CCR4-NOT complex in transcriptional elongation. *Genetics* 158, 627–634.

- Denis, C.L., Malvar, T., 1990. The CCR4 gene from *Saccharomyces cerevisiae* is required for both nonfermentative and spt-mediated gene expression. *Genetics* 124, 283–291.
- Denli, A.M., Tops, B.B.J., Plasterk, R.H.A., Ketting, R.F., Hannon, G.J., 2004. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432, 231–235.
- Dictenberg, J.B., Swanger, S.A., Antar, L.N., Singer, R.H., Bassell, G.J., 2008. A direct role for FMRP in activity-dependent dendritic mRNA transport links filopodial-spine morphogenesis to fragile X syndrome. *Dev. Cell* 14, 926–939.
- Dimberg, A., Karlberg, I., Nilsson, K., Oberg, F., 2003. Ser727/Tyr701-phosphorylated Stat1 is required for the regulation of c-Myc, cyclins, and p27Kip1 associated with ATRA-induced G0/G1 arrest of U-937 cells. *Blood* 102, 254–261.
- Dimitrova, L.N., Kuroha, K., Tatematsu, T., Inada, T., 2009. Nascent peptide-dependent translation arrest leads to Not4p-mediated protein degradation by the proteasome. *J. Biol. Chem.* 284, 10343–10352.
- Djebali, S., Davis, C.A., Merkel, A., Dobin, A., Lassmann, T., et al., 2012. Landscape of transcription in human cells. *Nature* 489, 101–108.
- Djuranovic, S., Nahvi, A., Green, R., 2012. miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. *Science* 336, 237–240.
- Doidge, R., Mittal, S., Aslam, A., Winkler, G.S., 2012. The anti-proliferative activity of BTG/TOB proteins is mediated via the Caf1a (CNOT7) and Caf1b (CNOT8) deadenylase subunits of the Ccr4-not complex. *Plos One* 7, e51331.
- Doma, M.K., Parker, R., 2006. Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* 440, 561–564.
- Dori-Bachash, M., Shalem, O., Manor, Y.S., Pilpel, Y., Tirosh, I., 2012. Widespread promoter-mediated coordination of transcription and mRNA degradation. *Genome Biol.* 13, R114.
- Dostert, C., Jouanguy, E., Irving, P., Troxler, L., Galiana-Arnoux, D., Hetru, C., Hoffmann, J.A., Imler, J.-L., 2005. The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of drosophila. *Nat. Immunol.* 6, 946–953.
- Draper, M.P., Liu, H.Y., Nelsbach, A.H., Mosley, S.P., Denis, C.L., 1994. CCR4 is a glucose-regulated transcription factor whose leucine-rich repeat binds several proteins important for placing CCR4 in its proper promoter context. *Mol. Cell. Biol.* 14, 4522–4531.
- Droescher, M., Begitt, A., Marg, A., Zacharias, M., Vinkemeier, U., 2011. Cytokine-induced paracrystals prolong the activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) and provide a model for the regulation of protein solubility by small ubiquitin-like modifier (SUMO). *J. Biol. Chem.* 286, 18731–18746.
- Du, K., Arai, S., Kawamura, T., Matsushita, A., Kurokawa, R., 2011. TLS and PRMT1 synergistically coactivate transcription at the survivin promoter through TLS arginine methylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404, 991–996.
- Durbin, J.E., Hackenmiller, R., Simon, M.C., Levy, D.E., 1996. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* 84, 443–450.
- Edwards, A.M., Kane, C.M., Young, R.A., Kornberg, R.D., 1991. Two dissociable subunits of yeast RNA polymerase II stimulate the initiation of transcription at a promoter in vitro. *J. Biol. Chem.* 266, 71–75.
- Ekengren, S., Hultmark, D., 2001. A family of Turandot-related genes in the humoral stress response of *Drosophila*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284, 998–1003.
- Elkon, R., Zlotorynski, E., Zeller, K.I., Agami, R., 2010. Major role for mRNA stability in shaping the kinetics of gene induction. *Bmc Genomics* 11, 259.

- Enssle, J., Kugler, W., Hentze, M.W., Kulozik, A.E., 1993. Determination of mRNA fate by different RNA polymerase II promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 10091–10095.
- Erickson, S.L., Lykke-Andersen, J., 2011. Cytoplasmic mRNP granules at a glance. *J. Cell Sci.* 124, 293–297.
- Eulalio, A., Helms, S., Fritsch, C., Fauser, M., Izaurralde, E., 2009a. A C-terminal silencing domain in GW182 is essential for miRNA function. *Rna New York N* 15, 1067–1077.
- Eulalio, A., Huntzinger, E., Izaurralde, E., 2008a. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 132, 9–14.
- Eulalio, A., Huntzinger, E., Izaurralde, E., 2008b. GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 346–353.
- Eulalio, A., Huntzinger, E., Nishihara, T., Rehwinkel, J., Fauser, M., Izaurralde, E., 2009b. Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *Rna New York N* 15, 21–32.
- Ezzeddine, N., Chang, T.-C., Zhu, W., Yamashita, A., Chen, C.-Y.A., Zhong, Z., Yamashita, Y., Zheng, D., Shyu, A.-B., 2007. Human TOB, an antiproliferative transcription factor, is a poly(A)-binding protein-dependent positive regulator of cytoplasmic mRNA deadenylation. *Mol. Cell. Biol.* 27, 7791–7801.
- Fabian, M.R., Sonenberg, N., 2012. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 586–593.
- Fagerlund, R., Mélen, K., Kinnunen, L., Julkunen, I., 2002. Arginine/lysine-rich nuclear localization signals mediate interactions between dimeric STATs and importin alpha 5. *J. Biol. Chem.* 277, 30072–30078.
- Fallini, C., Zhang, H., Su, Y., Silani, V., Singer, R.H., Rossoll, W., Bassell, G.J., 2011. The survival of motor neuron (SMN) protein interacts with the mRNA-binding protein HuD and regulates localization of poly(A) mRNA in primary motor neuron axons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 3914–3925.
- Fan, J., Yang, X., Wang, W., Wood, W.H., 3rd, Becker, K.G., Gorospe, M., 2002. Global analysis of stress-regulated mRNA turnover by using cDNA arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 10611–10616.
- Farajollahi, S., Maas, S., 2010. Molecular diversity through RNA editing: a balancing act. *Trends Genet. Tig* 26, 221–230.
- Feng, J., Bi, C., Clark, B.S., Mady, R., Shah, P., Kohtz, J.D., 2006. The Evf-2 noncoding RNA is transcribed from the Dlx-5/6 ultraconserved region and functions as a Dlx-2 transcriptional coactivator. *Genes Dev.* 20, 1470–1484.
- Fenger-Grøn, M., Fillman, C., Norrild, B., Lykke-Andersen, J., 2005. Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping. *Mol. Cell* 20, 905–915.
- Filipowicz, W., Pogacić, V., 2002. Biogenesis of small nucleolar ribonucleoproteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 319–327.
- Forrest, K.M., Gavis, E.R., 2003. Live imaging of endogenous RNA reveals a diffusion and entrapment mechanism for nanos mRNA localization in *Drosophila*. *Curr. Biol. Cb* 13, 1159–1168.
- Freeberg, M.A., Han, T., Moresco, J.J., Kong, A., Yang, Y.-C., Lu, Z.J., Yates, J.R., 3rd, Kim, J.K., 2013. Pervasive and dynamic protein binding sites of the mRNA transcriptome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biol.* 14, R13.
- Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., Bartel, D.P., 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19, 92–105.

- Frischmeyer, P.A., van Hoof, A., O'Donnell, K., Guerrierio, A.L., Parker, R., Dietz, H.C., 2002. An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science* 295, 2258–2261.
- Frolova, L., Le Goff, X., Rasmussen, H.H., Cheperegin, S., Drugeon, G., Kress, M., Arman, I., Haenni, A.L., Celis, J.E., Philippe, M., 1994. A highly conserved eukaryotic protein family possessing properties of polypeptide chain release factor. *Nature* 372, 701–703.
- Funakoshi, Y., Doi, Y., Hosoda, N., Uchida, N., Osawa, M., Shimada, I., Tsujimoto, M., Suzuki, T., Katada, T., Hoshino, S., 2007. Mechanism of mRNA deadenylation: evidence for a molecular interplay between translation termination factor eRF3 and mRNA deadenylases. *Genes Dev.* 21, 3135–3148.
- Furuichi, Y., Shatkin, A.J., 1989. Characterization of cap structures. *Methods Enzymol.* 180, 164–176.
- Gaillard, H., Tous, C., Botet, J., González-Aguilera, C., Quintero, M.J., Viladevall, L., García-Rubio, M.L., Rodríguez-Gil, A., Marín, A., Ariño, J., Revuelta, J.L., Chávez, S., Aguilera, A., 2009. Genome-wide analysis of factors affecting transcription elongation and DNA repair: a new role for PAF and Ccr4-not in transcription-coupled repair. *Plos Genet.* 5, e1000364.
- Gallo, C.M., Munro, E., Rasoloson, D., Merritt, C., Seydoux, G., 2008. Processing bodies and germ granules are distinct RNA granules that interact in *C. elegans* embryos. *Dev. Biol.* 323, 76–87.
- Gallouzi, I.E., Parker, F., Chebli, K., Maurier, F., Labourier, E., Barlat, I., Capony, J.P., Tocque, B., Tazi, J., 1998. A novel phosphorylation-dependent RNase activity of GAP-SH3 binding protein: a potential link between signal transduction and RNA stability. *Mol. Cell. Biol.* 18, 3956–3965.
- Gao, M., Fritz, D.T., Ford, L.P., Wilusz, J., 2000. Interaction between a poly(A)-specific ribonuclease and the 5' cap influences mRNA deadenylation rates in vitro. *Mol. Cell* 5, 479–488.
- Gao, Q., Das, B., Sherman, F., Maquat, L.E., 2005. Cap-binding protein 1-mediated and eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated pioneer rounds of translation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 4258–4263.
- Garapaty, S., Mahajan, M.A., Samuels, H.H., 2008. Components of the CCR4-NOT complex function as nuclear hormone receptor coactivators via association with the NRC-interacting Factor NIF-1. *J. Biol. Chem.* 283, 6806–6816.
- Gary, J.D., Lin, W.J., Yang, M.C., Herschman, H.R., Clarke, S., 1996. The predominant protein-arginine methyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 271, 12585–12594.
- Gatfield, D., Unterholzner, L., Ciccarelli, F.D., Bork, P., Izaurralde, E., 2003. Nonsense-mediated mRNA decay in *Drosophila*: at the intersection of the yeast and mammalian pathways. *Embo J.* 22, 3960–3970.
- Gavin, A.-C., Bösch, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.-M., Cruciat, C.-M., Remor, M., Höfert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M.-A., Copley, R.R., Edelmann, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G., Superti-Furga, G., 2002. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415, 141–147.
- Ghosh, A., Lima, C.D., 2010. Enzymology of RNA cap synthesis. *Wiley Interdiscip. Rev. Rna* 1, 152–172.

- Ghosh, A., Shuman, S., Lima, C.D., 2008. The structure of Fcp1, an essential RNA polymerase II CTD phosphatase. *Mol. Cell* 32, 478–490.
- Gilks, N., Kedersha, N., Ayodele, M., Shen, L., Stoecklin, G., Dember, L.M., Anderson, P., 2004. Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol. Biol. Cell* 15, 5383–5398.
- Goldstrohm, A.C., Hook, B.A., Seay, D.J., Wickens, M., 2006. PUF proteins bind Pop2p to regulate messenger RNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 533–539.
- Goldstrohm, A.C., Seay, D.J., Hook, B.A., Wickens, M., 2007. PUF protein-mediated deadenylation is catalyzed by Ccr4p. *J. Biol. Chem.* 282, 109–114.
- Goler-Baron, V., Selitrennik, M., Barkai, O., Haimovich, G., Lotan, R., Choder, M., 2008. Transcription in the nucleus and mRNA decay in the cytoplasm are coupled processes. *Genes Dev.* 22, 2022–2027.
- Gooch, J.L., Herrera, R.E., Yee, D., 2000. The role of p21 in interferon gamma-mediated growth inhibition of human breast cancer cells. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 11, 335–342.
- Graille, M., Séraphin, B., 2012. Surveillance pathways rescuing eukaryotic ribosomes lost in translation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 727–735.
- Gregory, R.I., Yan, K.-P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., Shiekhattar, R., 2004. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432, 235–240.
- Grifo, J.A., Abramson, R.D., Satler, C.A., Merrick, W.C., 1984. RNA-stimulated ATPase activity of eukaryotic initiation factors. *J. Biol. Chem.* 259, 8648–8654.
- Grönholm, J., Kaustio, M., Myllymäki, H., Kallio, J., Saarikettu, J., Kronhamn, J., Valanne, S., Silvennoinen, O., Rämet, M., 2012. Not4 enhances JAK/STAT pathway-dependent gene expression in *Drosophila* and in human cells. *Faseb J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 26, 1239–1250.
- Grosset, C., Chen, C.Y., Xu, N., Sonenberg, N., Jacquemin-Sablon, H., Shyu, A.B., 2000. A mechanism for translationally coupled mRNA turnover: interaction between the poly(A) tail and a c-fos RNA coding determinant via a protein complex. *Cell* 103, 29–40.
- Grünberg, S., Warfield, L., Hahn, S., 2012. Architecture of the RNA polymerase II preinitiation complex and mechanism of ATP-dependent promoter opening. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 788–796.
- Guarente, L., 1988. UASs and enhancers: common mechanism of transcriptional activation in yeast and mammals. *Cell* 52, 303–305.
- Guendel, I., Carpio, L., Pedati, C., Schwartz, A., Teal, C., Kashanchi, F., Kehn-Hall, K., 2010. Methylation of the tumor suppressor protein, BRCA1, influences its transcriptional cofactor function. *Plos One* 5, e11379.
- Gunawardane, L.S., Saito, K., Nishida, K.M., Miyoshi, K., Kawamura, Y., Nagami, T., Siomi, H., Siomi, M.C., 2007. A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. *Science* 315, 1587–1590.
- Hafner, M., Landthaler, M., Burger, L., Khorshid, M., Hausser, J., Berninger, P., Rothballer, A., Ascano, M., Jr, Jungkamp, A.-C., Munschauer, M., Ulrich, A., Wardle, G.S., Dewell, S., Zavolan, M., Tuschl, T., 2010. Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell* 141, 129–141.
- Haimovich, G., Choder, M., Singer, R.H., Trcek, T., 2013. The fate of the messenger is pre-determined: A new model for regulation of gene expression. *Biochim. Biophys. Acta.*
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Kim, Y.-K., Jin, H., Kim, V.N., 2004. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 18, 3016–3027.

- Harel-Sharvit, L., Eldad, N., Haimovich, G., Barkai, O., Duek, L., Choder, M., 2010. RNA polymerase II subunits link transcription and mRNA decay to translation. *Cell* 143, 552–563.
- Haspel, R.L., Salditt-Georgieff, M., Darnell, J.E., Jr, 1996. The rapid inactivation of nuclear tyrosine phosphorylated Stat1 depends upon a protein tyrosine phosphatase. *Embo J.* 15, 6262–6268.
- Hatfield, L., Beelman, C.A., Stevens, A., Parker, R., 1996. Mutations in trans-acting factors affecting mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 16, 5830–5838.
- He, Y., Fang, J., Taatjes, D.J., Nogales, E., 2013. Structural visualization of key steps in human transcription initiation. *Nature*.
- Helenius, K., Yang, Y., Tselykh, T.V., Pessa, H.K.J., Frilander, M.J., Mäkelä, T.P., 2011. Requirement of TFIIF kinase subunit Mat1 for RNA Pol II C-terminal domain Ser5 phosphorylation, transcription and mRNA turnover. *Nucleic Acids Res.* 39, 5025–5035.
- Henry, M.F., Silver, P.A., 1996. A novel methyltransferase (Hmt1p) modifies poly(A)⁺-RNA-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* 16, 3668–3678.
- Herrmann, F., Lee, J., Bedford, M.T., Fackelmayer, F.O., 2005. Dynamics of human protein arginine methyltransferase 1(PRMT1) in vivo. *J. Biol. Chem.* 280, 38005–38010.
- Hirose, Y., Manley, J.L., 1998. RNA polymerase II is an essential mRNA polyadenylation factor. *Nature* 395, 93–96.
- Hirose, Y., Ohkuma, Y., 2007a. Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II plays central roles in the integrated events of eucaryotic gene expression. *J. Biochem. (Tokyo)* 141, 601–608.
- Hirose, Y., Ohkuma, Y., 2007b. Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II plays central roles in the integrated events of eucaryotic gene expression. *J. Biochem. (Tokyo)* 141, 601–608.
- Hirose, Y., Tacke, R., Manley, J.L., 1999. Phosphorylated RNA polymerase II stimulates pre-mRNA splicing. *Genes Dev.* 13, 1234–1239.
- Hochstrasser, M., 1996. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.* 30, 405–439.
- Holmes, L.E.A., Campbell, S.G., De Long, S.K., Sachs, A.B., Ashe, M.P., 2004. Loss of translational control in yeast compromised for the major mRNA decay pathway. *Mol. Cell. Biol.* 24, 2998–3010.
- Hook, B.A., Goldstrohm, A.C., Seay, D.J., Wickens, M., 2007. Two yeast PUF proteins negatively regulate a single mRNA. *J. Biol. Chem.* 282, 15430–15438.
- Horiuchi, M., Takeuchi, K., Noda, N., Muroya, N., Suzuki, T., Nakamura, T., Kawamura-Tsuzuku, J., Takahashi, K., Yamamoto, T., Inagaki, F., 2009. Structural basis for the antiproliferative activity of the Tob-hCaf1 complex. *J. Biol. Chem.* 284, 13244–13255.
- Horvath, C.M., Wen, Z., Darnell, J.E., Jr, 1995. A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain. *Genes Dev.* 9, 984–994.
- Hou, X.S., Melnick, M.B., Perrimon, N., 1996. Marelle acts downstream of the *Drosophila* HOP/JAK kinase and encodes a protein similar to the mammalian STATs. *Cell* 84, 411–419.
- Huang, S., Bucana, C.D., Van Arsdall, M., Fidler, I.J., 2002. Stat1 negatively regulates angiogenesis, tumorigenicity and metastasis of tumor cells. *Oncogene* 21, 2504–2512.

- Huisinga, K.L., Pugh, B.F., 2004. A genome-wide housekeeping role for TFIID and a highly regulated stress-related role for SAGA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* 13, 573–585.
- Hundsdoerfer, P., Thoma, C., Hentze, M.W., 2005. Eukaryotic translation initiation factor 4GI and p97 promote cellular internal ribosome entry sequence-driven translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 13421–13426.
- Huntzinger, E., Kuzuoglu-Öztürk, D., Braun, J.E., Eulalio, A., Wohlbold, L., Izaurralde, E., 2013. The interactions of GW182 proteins with PABP and deadenylases are required for both translational repression and degradation of miRNA targets. *Nucleic Acids Res.* 41, 978–994.
- Imataka, H., Olsen, H.S., Sonenberg, N., 1997. A new translational regulator with homology to eukaryotic translation initiation factor 4G. *Embo J.* 16, 817–825.
- Inada, T., Aiba, H., 2005. Translation of aberrant mRNAs lacking a termination codon or with a shortened 3'-UTR is repressed after initiation in yeast. *Embo J.* 24, 1584–1595.
- Ioannidis, P., Havredaki, M., Courtis, N., Trangas, T., 1996. In vivo generation of 3' and 5' truncated species in the process of c-myc mRNA decay. *Nucleic Acids Res.* 24, 4969–4977.
- Ishigaki, Y., Li, X., Serin, G., Maquat, L.E., 2001. Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell* 106, 607–617.
- Ishizu, H., Siomi, H., Siomi, M.C., 2012. Biology of PIWI-interacting RNAs: new insights into biogenesis and function inside and outside of germlines. *Genes Dev.* 26, 2361–2373.
- Ito, K., Inoue, T., Yokoyama, K., Morita, M., Suzuki, T., Yamamoto, T., 2011. CNOT2 depletion disrupts and inhibits the CCR4-NOT deadenylase complex and induces apoptotic cell death. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 16, 368–379.
- Ito, T., Bulger, M., Pazin, M.J., Kobayashi, R., Kadonaga, J.T., 1997. ACF, an ISWI-containing and ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor. *Cell* 90, 145–155.
- Jaehning, J.A., 2010. The Paf1 complex: platform or player in RNA polymerase II transcription? *Biochim. Biophys. Acta* 1799, 379–388.
- Jakymiw, A., Lian, S., Eystathiou, T., Li, S., Satoh, M., Hamel, J.C., Fritzler, M.J., Chan, E.K.L., 2005. Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nat. Cell Biol.* 7, 1267–1274.
- Jambhekar, A., Derisi, J.L., 2007. Cis-acting determinants of asymmetric, cytoplasmic RNA transport. *Rna New York N* 13, 625–642.
- Jani, D., Lutz, S., Hurt, E., Laskey, R.A., Stewart, M., Wickramasinghe, V.O., 2012. Functional and structural characterization of the mammalian TREX-2 complex that links transcription with nuclear messenger RNA export. *Nucleic Acids Res.* 40, 4562–4573.
- Jasiak, A.J., Hartmann, H., Karakasili, E., Kalocsay, M., Flatley, A., Kremmer, E., Strässer, K., Martin, D.E., Söding, J., Cramer, P., 2008. Genome-associated RNA polymerase II includes the dissociable Rpb4/7 subcomplex. *J. Biol. Chem.* 283, 26423–26427.
- Jayne, S., Zwartjes, C.G.M., van Schaik, F.M.A., Timmers, H.T.M., 2006. Involvement of the SMRT/NCOR-HDAC3 complex in transcriptional repression by the CNOT2 subunit of the human Ccr4-Not complex. *Biochem. J.* 398, 461–467.
- Jenuwein, T., Allis, C.D., 2001. Translating the histone code. *Science* 293, 1074–1080.
- Jeske, M., Meyer, S., Temme, C., Freudenreich, D., Wahle, E., 2006. Rapid ATP-dependent deadenylation of nanos mRNA in a cell-free system from *Drosophila* embryos. *J. Biol. Chem.* 281, 25124–25133.

- Johnson, T.L., Vilardeell, J., 2012. Regulated pre-mRNA splicing: the ghostwriter of the eukaryotic genome. *Biochim. Biophys. Acta* 1819, 538–545.
- Johnstone, O., Lasko, P., 2001. Translational regulation and RNA localization in *Drosophila* oocytes and embryos. *Annu. Rev. Genet.* 35, 365–406.
- Jonas, S., Weichenrieder, O., Izaurralde, E., 2013. An unusual arrangement of two 14-3-3-like domains in the SMG5-SMG7 heterodimer is required for efficient nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev.* 27, 211–225.
- Kadener, S., Cramer, P., Nogués, G., Cazalla, D., de la Mata, M., Fededa, J.P., Werbajh, S.E., Srebrow, A., Kornblihtt, A.R., 2001. Antagonistic effects of T-Ag and VP16 reveal a role for RNA pol II elongation on alternative splicing. *Embo J.* 20, 5759–5768.
- Kamenski, T., Heilmeyer, S., Meinhart, A., Cramer, P., 2004. Structure and mechanism of RNA polymerase II CTD phosphatases. *Mol. Cell* 15, 399–407.
- Kapranov, P., Cheng, J., Dike, S., Nix, D.A., Duttagupta, R., Willingham, A.T., Stadler, P.F., Hertel, J., Hackermüller, J., Hofacker, I.L., Bell, I., Cheung, E., Drenkow, J., Dumais, E., Patel, S., Helt, G., Ganesh, M., Ghosh, S., Piccolboni, A., Sementchenko, V., Tammana, H., Gingeras, T.R., 2007. RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science* 316, 1484–1488.
- Kashima, I., Yamashita, A., Izumi, N., Kataoka, N., Morishita, R., Hoshino, S., Ohno, M., Dreyfuss, G., Ohno, S., 2006. Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev.* 20, 355–367.
- Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M.J., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Golan, D.E., Anderson, P., 2005. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J. Cell Biol.* 169, 871–884.
- Kedersha, N.L., Gupta, M., Li, W., Miller, I., Anderson, P., 1999. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* 147, 1431–1442.
- Kerr, S.C., Azzouz, N., Fuchs, S.M., Collart, M.A., Strahl, B.D., Corbett, A.H., Laribee, R.N., 2011. The Ccr4-Not complex interacts with the mRNA export machinery. *Plos One* 6, e18302.
- Khvorova, A., Reynolds, A., Jayasena, S.D., 2003. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209–216.
- Kim, M., Bellini, M., Ceman, S., 2009. Fragile X mental retardation protein FMRP binds mRNAs in the nucleus. *Mol. Cell Biol.* 29, 214–228.
- Kim, T.K., Maniatis, T., 1996. Regulation of interferon-gamma-activated STAT1 by the ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 273, 1717–1719.
- Kimball, S.R., Horetsky, R.L., Ron, D., Jefferson, L.S., Harding, H.P., 2003. Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284, C273–284.
- Kiriakidou, M., Tan, G.S., Lamprinak, S., De Planell-Saguer, M., Nelson, P.T., Mourelatos, Z., 2007. An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell* 129, 1141–1151.
- Kloc, M., Dougherty, M.T., Bilinski, S., Chan, A.P., Brey, E., King, M.L., Patrick, C.W., Jr, Etkin, L.D., 2002. Three-dimensional ultrastructural analysis of RNA distribution within germinal granules of *Xenopus*. *Dev. Biol.* 241, 79–93.
- Kobor, M.S., Greenblatt, J., 2002. Regulation of transcription elongation by phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 1577, 261–275.
- Komyod, W., Bauer, U.-M., Heinrich, P.C., Haan, S., Behrmann, I., 2005. Are STATS arginine-methylated? *J. Biol. Chem.* 280, 21700–21705.

- Kornberg, R.D., 1977. Structure of chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* 46, 931–954.
- Kornberg, R.D., 2007. The molecular basis of eucaryotic transcription. *Cell Death Differ.* 14, 1989–1997.
- Körner, C.G., Wahle, E., 1997. Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3'-exoribonuclease. *J. Biol. Chem.* 272, 10448–10456.
- Körner, C.G., Wormington, M., Muckenthaler, M., Schneider, S., Dehlin, E., Wahle, E., 1998. The deadenylating nuclease (DAN) is involved in poly(A) tail removal during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *Embo J.* 17, 5427–5437.
- Kotaja, N., Bhattacharyya, S.N., Jaskiewicz, L., Kimmins, S., Parvinen, M., Filipowicz, W., Sassone-Corsi, P., 2006. The chromatoid body of male germ cells: similarity with processing bodies and presence of Dicer and microRNA pathway components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2647–2652.
- Kotaja, N., Sassone-Corsi, P., 2007. The chromatoid body: a germ-cell-specific RNA-processing centre. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 85–90.
- Kovarik, P., Mangold, M., Ramsauer, K., Heidari, H., Steinborn, R., Zotter, A., Levy, D.E., Müller, M., Decker, T., 2001. Specificity of signaling by STAT1 depends on SH2 and C-terminal domains that regulate Ser727 phosphorylation, differentially affecting specific target gene expression. *Embo J.* 20, 91–100.
- Krämer, O.H., Knauer, S.K., Greiner, G., Jandt, E., Reichardt, S., Gührs, K.-H., Stauber, R.H., Böhmer, F.D., Heinzl, T., 2009. A phosphorylation-acetylation switch regulates STAT1 signaling. *Genes Dev.* 23, 223–235.
- Krause, C.D., He, W., Kolenko, S., Pestka, S., 2006a. Modulation of the activation of Stat1 by the interferon-gamma receptor complex. *Cell Res.* 16, 113–123.
- Krause, C.D., Lavnikova, N., Xie, J., Mei, E., Mirochnitchenko, O.V., Jia, Y., Hochstrasser, R.M., Pestka, S., 2006b. Preassembly and ligand-induced restructuring of the chains of the IFN-gamma receptor complex: the roles of Jak kinases, Stat1 and the receptor chains. *Cell Res.* 16, 55–69.
- Kruk, J.A., Dutta, A., Fu, J., Gilmour, D.S., Reese, J.C., 2011. The multifunctional Ccr4-Not complex directly promotes transcription elongation. *Genes Dev.* 25, 581–593.
- Kufel, J., Bousquet-Antonelli, C., Beggs, J.D., Tollervey, D., 2004. Nuclear pre-mRNA decapping and 5' degradation in yeast require the Lsm2-8p complex. *Mol. Cell. Biol.* 24, 9646–9657.
- Kuo, M.H., Allis, C.D., 1998. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 20, 615–626.
- Kwak, Y.T., Guo, J., Prajapati, S., Park, K.-J., Surabhi, R.M., Miller, B., Gehrig, P., Gaynor, R.B., 2003. Methylation of SPT5 regulates its interaction with RNA polymerase II and transcriptional elongation properties. *Mol. Cell* 11, 1055–1066.
- LaCava, J., Houseley, J., Saveanu, C., Petfalski, E., Thompson, E., Jacquier, A., Tollervey, D., 2005. RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell* 121, 713–724.
- Lai, F., Orom, U.A., Cesaroni, M., Beringer, M., Taatjes, D.J., Blobel, G.A., Shiekhata, R., 2013. Activating RNAs associate with Mediator to enhance chromatin architecture and transcription. *Nature* 494, 497–501.
- Lai, W.S., Kennington, E.A., Blackshear, P.J., 2003. Tristetraprolin and its family members can promote the cell-free deadenylation of AU-rich element-containing mRNAs by poly(A) ribonuclease. *Mol. Cell. Biol.* 23, 3798–3812.
- Lal, A., Mazan-Mamczarz, K., Kawai, T., Yang, X., Martindale, J.L., Gorospe, M., 2004. Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs. *Embo J.* 23, 3092–3102.

- Lamond, A.I., Spector, D.L., 2003. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 605–612.
- Lamphear, B.J., Kirchweger, R., Skern, T., Rhoads, R.E., 1995. Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation. *J. Biol. Chem.* 270, 21975–21983.
- Landthaler, M., Yalcin, A., Tuschl, T., 2004. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr. Biol. Cb* 14, 2162–2167.
- Laribee, R.N., Shibata, Y., Mersman, D.P., Collins, S.R., Kemmeren, P., Roguev, A., Weissman, J.S., Briggs, S.D., Krogan, N.J., Strahl, B.D., 2007. CCR4/NOT complex associates with the proteasome and regulates histone methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 5836–5841.
- Lau, N.-C., Kolkman, A., van Schaik, F.M.A., Mulder, K.W., Pijnappel, W.W.M.P., Heck, A.J.R., Timmers, H.T.M., 2009. Human Ccr4-Not complexes contain variable deadenylase subunits. *Biochem. J.* 422, 443–453.
- Laurencikienė, J., Källman, A.M., Fong, N., Bentley, D.L., Ohman, M., 2006. RNA editing and alternative splicing: the importance of co-transcriptional coordination. *EMBO Rep.* 7, 303–307.
- Lauwers, A., Twyffels, L., Soin, R., Wauquier, C., Kruys, V., Gueydan, C., 2009. Post-transcriptional Regulation of Genes Encoding Anti-microbial Peptides in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* 284, 8973–8983.
- Le Hir, H., Gatfield, D., Izaurralde, E., Moore, M.J., 2001. The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *Embo J.* 20, 4987–4997.
- Le Hir, H., Izaurralde, E., Maquat, L.E., Moore, M.J., 2000. The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *Embo J.* 19, 6860–6869.
- Le Romancer, M., Treilleux, I., Leconte, N., Robin-Lespinasse, Y., Sentis, S., Boucheikioua-Bouzaghrou, K., Goddard, S., Gobert-Gosse, S., Corbo, L., 2008. Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation by PRMT1. *Mol. Cell* 31, 212–221.
- Le Thomas, A., Rogers, A.K., Webster, A., Marinov, G.K., Liao, S.E., Perkins, E.M., Hur, J.K., Aravin, A.A., Tóth, K.F., 2013. Piwi induces piRNA-guided transcriptional silencing and establishment of a repressive chromatin state. *Genes Dev.* 27, 390–399.
- Lécuyer, E., Yoshida, H., Parthasarathy, N., Alm, C., Babak, T., Cerovina, T., Hughes, T.R., Tomancak, P., Krause, H.M., 2007. Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function. *Cell* 131, 174–187.
- Lee, D.Y., Teyssier, C., Strahl, B.D., Stallcup, M.R., 2005. Role of protein methylation in regulation of transcription. *Endocr. Rev.* 26, 147–170.
- Lee, E.K., Kim, H.H., Kuwano, Y., Abdelmohsen, K., Srikantan, S., Subaran, S.S., Gleichmann, M., Mughal, M.R., Martindale, J.L., Yang, X., Worley, P.F., Mattson, M.P., Gorospe, M., 2010. hnRNP C promotes APP translation by competing with FMRP for APP mRNA recruitment to P bodies. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 732–739.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., Kim, V.N., 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415–419.
- Lee, Y.S., Nakahara, K., Pham, J.W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E.J., Carthew, R.W., 2004. Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* 117, 69–81.

- Lejeune, F., Li, X., Maquat, L.E., 2003. Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylating, and exonucleolytic activities. *Mol. Cell* 12, 675–687.
- Lemaire, M., Collart, M.A., 2000. The TATA-binding protein-associated factor yTafII19p functionally interacts with components of the global transcriptional regulator Ccr4-Not complex and physically interacts with the Not5 subunit. *J. Biol. Chem.* 275, 26925–26934.
- Lenissen, E., James, N., Pedruzzi, I., Dubouloz, F., Cameroni, E., Bisig, R., Maillet, L., Werner, M., Roosen, J., Petrovic, K., Winderickx, J., Collart, M.A., Virgilio, C.D., 2005. The Ccr4-Not Complex Independently Controls both Msn2-Dependent Transcriptional Activation—via a Newly Identified Glc7/Bud14 Type I Protein Phosphatase Module—and TFIID Promoter Distribution. *Mol. Cell. Biol.* 25, 488–498.
- Leppek, K., Schott, J., Reitter, S., Poetz, F., Hammond, M.C., Stoecklin, G., 2013. Roquin Promotes Constitutive mRNA Decay via a Conserved Class of Stem-Loop Recognition Motifs. *Cell* 153, 869–881.
- Lerit, D.A., Gavis, E.R., 2011. Transport of germ plasm on astral microtubules directs germ cell development in *Drosophila*. *Curr. Biol. Cb* 21, 439–448.
- Levy, D.E., Darnell, J.E., Jr, 2002. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 651–662.
- Lewis, B.P., Burge, C.B., Bartel, D.P., 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15–20.
- Li, L., Roy, K., Katyal, S., Sun, X., Bléoo, S., Godbout, R., 2006. Dynamic nature of cleavage bodies and their spatial relationship to DDX1 bodies, Cajal bodies, and gems. *Mol. Biol. Cell* 17, 1126–1140.
- Li, Q., Wrangé, O., Eriksson, P., 1997. The role of chromatin in transcriptional regulation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 731–742.
- Li, X., Hu, X., Patel, B., Zhou, Z., Liang, S., Ybarra, R., Qiu, Y., Felsenfeld, G., Bungert, J., Huang, S., 2010. H4R3 methylation facilitates beta-globin transcription by regulating histone acetyltransferase binding and H3 acetylation. *Blood* 115, 2028–2037.
- Liang, W., Li, Changbao, Liu, F., Jiang, H., Li, S., Sun, J., Wu, X., Li, Chuanyou, 2009a. The Arabidopsis homologs of CCR4-associated factor 1 show mRNA deadenylation activity and play a role in plant defence responses. *Cell Res.* 19, 307–316.
- Liang, W., Li, Changbao, Liu, F., Jiang, H., Li, S., Sun, J., Wu, X., Li, Chuanyou, 2009b. The Arabidopsis homologs of CCR4-associated factor 1 show mRNA deadenylation activity and play a role in plant defence responses. *Cell Res.* 19, 307–316.
- Libri, D., Dower, K., Boulay, J., Thomsen, R., Rosbash, M., Jensen, T.H., 2002. Interactions between mRNA export commitment, 3'-end quality control, and nuclear degradation. *Mol. Cell. Biol.* 22, 8254–8266.
- Lim, A.K., Tao, L., Kai, T., 2009. piRNAs mediate posttranscriptional retroelement silencing and localization to pi-bodies in the *Drosophila* germline. *J. Cell Biol.* 186, 333–342.
- Linder, P., Slonimski, P.P., 1989. An essential yeast protein, encoded by duplicated genes TIF1 and TIF2 and homologous to the mammalian translation initiation factor eIF-4A, can suppress a mitochondrial missense mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 2286–2290.
- Linker, K., Pautz, A., Fechir, M., Hubrich, T., Greeve, J., Kleinert, H., 2005. Involvement of KSRP in the post-transcriptional regulation of human iNOS expression-complex interplay of KSRP with TTP and HuR. *Nucleic Acids Res.* 33, 4813–4827.

- Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S.A., Chung, C.D., Chang, D.D., Shuai, K., 1998. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 10626–10631.
- Liu, B., Mink, S., Wong, K.A., Stein, N., Getman, C., Dempsey, P.W., Wu, H., Shuai, K., 2004. PIAS1 selectively inhibits interferon-inducible genes and is important in innate immunity. *Nat. Immunol.* 5, 891–898.
- Liu, H., Rodgers, N.D., Jiao, X., Kiledjian, M., 2002. The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases. *Embo J.* 21, 4699–4708.
- Liu, H.Y., Badarinarayana, V., Audino, D.C., Rappsilber, J., Mann, M., Denis, C.L., 1998. The NOT proteins are part of the CCR4 transcriptional complex and affect gene expression both positively and negatively. *Embo J.* 17, 1096–1106.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.-J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., Hannon, G.J., 2004. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305, 1437–1441.
- Liu, J., Rivas, F.V., Wohlschlegel, J., Yates, J.R., 3rd, Parker, R., Hannon, G.J., 2005. A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat. Cell Biol.* 7, 1261–1266.
- Liu, Q., Dreyfuss, G., 1995. In vivo and in vitro arginine methylation of RNA-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2800–2808.
- Long, R.M., Gu, W., Lorimer, E., Singer, R.H., Chartrand, P., 2000. She2p is a novel RNA-binding protein that recruits the Myo4p-She3p complex to ASH1 mRNA. *Embo J.* 19, 6592–6601.
- Lotan, R., Bar-On, V.G., Harel-Sharvit, L., Duek, L., Melamed, D., Choder, M., 2005. The RNA polymerase II subunit Rpb4p mediates decay of a specific class of mRNAs. *Genes Dev.* 19, 3004–3016.
- Lotan, R., Goler-Baron, V., Duek, L., Haimovich, G., Choder, M., 2007. The Rpb7p subunit of yeast RNA polymerase II plays roles in the two major cytoplasmic mRNA decay mechanisms. *J. Cell Biol.* 178, 1133–1143.
- Lowell, J.E., Rudner, D.Z., Sachs, A.B., 1992. 3'-UTR-dependent deadenylation by the yeast poly(A) nuclease. *Genes Dev.* 6, 2088–2099.
- Luco, R.F., Allo, M., Schor, I.E., Kornblihtt, A.R., Misteli, T., 2011. Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing. *Cell* 144, 16–26.
- Luco, R.F., Pan, Q., Tominaga, K., Blencowe, B.J., Pereira-Smith, O.M., Misteli, T., 2010. Regulation of alternative splicing by histone modifications. *Science* 327, 996–1000.
- Lukong, K.E., Richard, S., 2004. Arginine methylation signals mRNA export. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 914–915.
- Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., Kutay, U., 2004. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303, 95–98.
- Lutz, C.S., 2008. Alternative polyadenylation: a twist on mRNA 3' end formation. *Acs Chem. Biol.* 3, 609–617.
- Lykke-Andersen, J., 2002. Identification of a human decapping complex associated with hUpf proteins in nonsense-mediated decay. *Mol. Cell. Biol.* 22, 8114–8121.
- Lykke-Andersen, J., Wagner, E., 2005. Recruitment and activation of mRNA decay enzymes by two ARE-mediated decay activation domains in the proteins TTP and BRF-1. *Genes Dev.* 19, 351–361.
- Lykke-Andersen, S., Tomecki, R., Jensen, T.H., Dziembowski, A., 2011. The eukaryotic RNA exosome: same scaffold but variable catalytic subunits. *Rna Biol.* 8, 61–66.

- Ma, J.-B., Yuan, Y.-R., Meister, G., Pei, Y., Tuschl, T., Patel, D.J., 2005. Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature* 434, 666–670.
- Maag, D., Fekete, C.A., Gryczynski, Z., Lorsch, J.R., 2005. A conformational change in the eukaryotic translation preinitiation complex and release of eIF1 signal recognition of the start codon. *Mol. Cell* 17, 265–275.
- Maniatis, T., Reed, R., 1987. The role of small nuclear ribonucleoprotein particles in pre-mRNA splicing. *Nature* 325, 673–678.
- Mao, Y.S., Sunwoo, H., Zhang, B., Spector, D.L., 2011. Direct visualization of the co-transcriptional assembly of a nuclear body by noncoding RNAs. *Nat. Cell Biol.* 13, 95–101.
- Marchand, V., Gaspar, I., Ephrussi, A., 2012. An intracellular transmission control protocol: assembly and transport of ribonucleoprotein complexes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 202–210.
- Mariner, P.D., Walters, R.D., Espinoza, C.A., Drullinger, L.F., Wagner, S.D., Kugel, J.F., Goodrich, J.A., 2008. Human Alu RNA is a modular transacting repressor of mRNA transcription during heat shock. *Mol. Cell* 29, 499–509.
- Martinez-Rucobo, F.W., Cramer, P., 2013. Structural basis of transcription elongation. *Biochim. Biophys. Acta* 1829, 9–19.
- Matera, A.G., Frey, M.R., 1998. Coiled bodies and gems: Janus or gemini? *Am. J. Hum. Genet.* 63, 317–321.
- Matsui, T., Segall, J., Weil, P.A., Roeder, R.G., 1980. Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 255, 11992–11996.
- Mauxion, F., Chen, C.-Y.A., Séraphin, B., Shyu, A.-B., 2009. BTG/TOB factors impact deadenylases. *Trends Biochem. Sci.* 34, 640–647.
- Mauxion, F., Faux, C., Séraphin, B., 2008. The BTG2 protein is a general activator of mRNA deadenylation. *Embo J.* 27, 1039–1048.
- Mauxion, F., Prève, B., Séraphin, B., 2013. C2ORF29/CNOT11 and CNOT10 form a new module of the CCR4-NOT complex. *Rna Biol.* 10, 267–276.
- Mazroui, R., Huot, M.-E., Tremblay, S., Filion, C., Labelle, Y., Khandjian, E.W., 2002. Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression. *Hum. Mol. Genet.* 11, 3007–3017.
- Mazroui, R., Sukarieh, R., Bordeleau, M.-E., Kaufman, R.J., Northcote, P., Tanaka, J., Gallouzi, I., Pelletier, J., 2006. Inhibition of ribosome recruitment induces stress granule formation independently of eukaryotic initiation factor 2alpha phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* 17, 4212–4219.
- McBride, K.M., Banninger, G., McDonald, C., Reich, N.C., 2002. Regulated nuclear import of the STAT1 transcription factor by direct binding of importin-alpha. *Embo J.* 21, 1754–1763.
- McCloskey, A., Taniguchi, I., Shinmyozu, K., Ohno, M., 2012. hnRNP C tetramer measures RNA length to classify RNA polymerase II transcripts for export. *Science* 335, 1643–1646.
- McCracken, S., Fong, N., Rosonina, E., Yankulov, K., Brothers, G., Siderovski, D., Hessel, A., Foster, S., Shuman, S., Bentley, D.L., 1997. 5'-Capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes Dev.* 11, 3306–3318.
- Meissner, T., Krause, E., Lödige, I., Vinkemeier, U., 2004. Arginine methylation of STAT1: a reassessment. *Cell* 119, 587–589; discussion 589–590.

- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., Tuschl, T., 2004. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell* 15, 185–197.
- Meister, G., Landthaler, M., Peters, L., Chen, P.Y., Urlaub, H., Lührmann, R., Tuschl, T., 2005. Identification of novel argonaute-associated proteins. *Curr. Biol. Cb* 15, 2149–2155.
- Melen, K., Kinnunen, L., Julkunen, I., 2001. Arginine/lysine-rich structural element is involved in interferon-induced nuclear import of STATs. *J. Biol. Chem.* 276, 16447–16455.
- Meraz, M.A., White, J.M., Sheehan, K.C., Bach, E.A., Rodig, S.J., Dighe, A.S., Kaplan, D.H., Riley, J.K., Greenlund, A.C., Campbell, D., Carver-Moore, K., DuBois, R.N., Clark, R., Aguet, M., Schreiber, R.D., 1996. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 84, 431–442.
- Mercer, T.R., Dinger, M.E., Mattick, J.S., 2009. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat. Rev. Genet.* 10, 155–159.
- Mersman, D.P., Du, H.-N., Fingerman, I.M., South, P.F., Briggs, S.D., 2009. Polyubiquitination of the demethylase Jhd2 controls histone methylation and gene expression. *Genes Dev.* 23, 951–962.
- Mette, M.F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M.A., Matzke, A.J., 2000. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *Embo J.* 19, 5194–5201.
- Micklem, D.R., 1995. mRNA localisation during development. *Dev. Biol.* 172, 377–395.
- Miller, J.E., Reese, J.C., 2012. Ccr4-Not complex: the control freak of eukaryotic cells. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 47, 315–333.
- Mitchell, P., Tollervey, D., 2003. An NMD pathway in yeast involving accelerated deadenylation and exosome-mediated 3'→5' degradation. *Mol. Cell* 11, 1405–1413.
- Mittal, S., Aslam, A., Doidge, R., Medica, R., Winkler, G.S., 2011a. The Ccr4a (CNOT6) and Ccr4b (CNOT6L) deadenylase subunits of the human Ccr4-Not complex contribute to the prevention of cell death and senescence. *Mol. Biol. Cell* 22, 748–758.
- Mittal, S., Aslam, A., Doidge, R., Medica, R., Winkler, G.S., 2011b. The Ccr4a (CNOT6) and Ccr4b (CNOT6L) deadenylase subunits of the human Ccr4-Not complex contribute to the prevention of cell death and senescence. *Mol. Biol. Cell* 22, 748–758.
- Moazed, D., 2009. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature* 457, 413–420.
- Mokas, S., Mills, J.R., Garreau, C., Fournier, M.-J., Robert, F., Arya, P., Kaufman, R.J., Pelletier, J., Mazroui, R., 2009. Uncoupling stress granule assembly and translation initiation inhibition. *Mol. Biol. Cell* 20, 2673–2683.
- Molin, C., Jauhainen, A., Warringer, J., Nerman, O., Sunnerhagen, P., 2009. mRNA stability changes precede changes in steady-state mRNA amounts during hyperosmotic stress. *Rna New York N* 15, 600–614.
- Mollet, S., Cougot, N., Wilczynska, A., Dautry, F., Kress, M., Bertrand, E., Weil, D., 2008. Translationally repressed mRNA transiently cycles through stress granules during stress. *Mol. Biol. Cell* 19, 4469–4479.
- Monsalve, M., Wu, Z., Adelmant, G., Puigserver, P., Fan, M., Spiegelman, B.M., 2000. Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1. *Mol. Cell* 6, 307–316.
- Moore, M.J., 2005. From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* 309, 1514–1518.

- Morel, A.-P., Sentis, S., Bianchin, C., Le Romancer, M., Jonard, L., Rostan, M.-C., Rimokh, R., Corbo, L., 2003. BTG2 antiproliferative protein interacts with the human CCR4 complex existing in vivo in three cell-cycle-regulated forms. *J. Cell Sci.* 116, 2929–2936.
- Morillo-Huesca, M., Vanti, M., Chávez, S., 2006. A simple in vivo assay for measuring the efficiency of gene length-dependent processes in yeast mRNA biogenesis. *Febs J.* 273, 756–769.
- Morita, M., Oike, Y., Nagashima, T., Kadomatsu, T., Tabata, M., Suzuki, T., Nakamura, T., Yoshida, N., Okada, M., Yamamoto, T., 2011. Obesity resistance and increased hepatic expression of catabolism-related mRNAs in *Cnot3*^{+/-} mice. *Embo J.* 30, 4678–4691.
- Morita, M., Suzuki, T., Nakamura, T., Yokoyama, K., Miyasaka, T., Yamamoto, T., 2007. Depletion of mammalian CCR4b deadenylase triggers elevation of the p27Kip1 mRNA level and impairs cell growth. *Mol. Cell. Biol.* 27, 4980–4990.
- Morozov, I.Y., Jones, M.G., Razak, A.A., Rigden, D.J., Caddick, M.X., 2010. CUCU modification of mRNA promotes decapping and transcript degradation in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* 30, 460–469.
- Mösch, H.U., Fink, G.R., 1997. Dissection of filamentous growth by transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 145, 671–684.
- Mowen, K.A., Tang, J., Zhu, W., Schurter, B.T., Shuai, K., Herschman, H.R., David, M., 2001. Arginine methylation of STAT1 modulates IFN α /beta-induced transcription. *Cell* 104, 731–741.
- Muhlrad, D., Decker, C.J., Parker, R., 1994. Deadenylation of the unstable mRNA encoded by the yeast MFA2 gene leads to decapping followed by 5'→3' digestion of the transcript. *Genes Dev.* 8, 855–866.
- Muhlrad, D., Parker, R., 2005. The yeast EDC1 mRNA undergoes deadenylation-independent decapping stimulated by Not2p, Not4p, and Not5p. *Embo J.* 24, 1033–1045.
- Mulder, K.W., Brenkman, A.B., Inagaki, A., van den Broek, N.J.F., Timmers, H.T.M., 2007a. Regulation of histone H3K4 tri-methylation and PAF complex recruitment by the Ccr4-Not complex. *Nucleic Acids Res.* 35, 2428–2439.
- Mulder, K.W., Inagaki, A., Cameroni, E., Mousson, F., Winkler, G.S., De Virgilio, C., Collart, M.A., Timmers, H.T.M., 2007b. Modulation of Ubc4p/Ubc5p-mediated stress responses by the RING-finger-dependent ubiquitin-protein ligase Not4p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 176, 181–192.
- Mulder, K.W., Winkler, G.S., Timmers, H.T.M., 2005. DNA damage and replication stress induced transcription of RNR genes is dependent on the Ccr4-Not complex. *Nucleic Acids Res.* 33, 6384–6392.
- Müller-McNicoll, M., Neugebauer, K.M., 2013. How cells get the message: dynamic assembly and function of mRNA-protein complexes. *Nat. Rev. Genet.* 14, 275–287.
- Nagamori, I., Sassone-Corsi, P., 2008. The chromatoid body of male germ cells: epigenetic control and miRNA pathway. *Cell Cycle Georget. Tex* 7, 3503–3508.
- Nakagawa, S., Hirose, T., 2012. Paraspeckle nuclear bodies--useful uselessness? *Cell. Mol. Life Sci. Cmls* 69, 3027–3036.
- Nakamura, T., Yao, R., Ogawa, T., Suzuki, T., Ito, C., Tsunekawa, N., Inoue, K., Ajima, R., Miyasaka, T., Yoshida, Y., Ogura, A., Toshimori, K., Noce, T., Yamamoto, T., Noda, T., 2004. Oligo-astheno-teratozoospermia in mice lacking *Cnot7*, a regulator of retinoid X receptor beta. *Nat. Genet.* 36, 528–533.
- Nasertorabi, F., Batisse, C., Diepholz, M., Suck, D., Böttcher, B., 2011. Insights into the structure of the CCR4-NOT complex by electron microscopy. *Febs Lett.* 585, 2182–2186.

- Nicholson, T.B., Chen, T., Richard, S., 2009. The physiological and pathophysiological role of PRMT1-mediated protein arginine methylation. *Pharmacol. Res. Off. J. Ital. Pharmacol. Soc.* 60, 466–474.
- Nishida, K.M., Saito, K., Mori, T., Kawamura, Y., Nagami-Okada, T., Inagaki, S., Siomi, H., Siomi, M.C., 2007. Gene silencing mechanisms mediated by Aubergine piRNA complexes in *Drosophila* male gonad. *Rna New York N* 13, 1911–1922.
- Nogues, G., Kadener, S., Cramer, P., Bentley, D., Kornblihtt, A.R., 2002. Transcriptional activators differ in their abilities to control alternative splicing. *J. Biol. Chem.* 277, 43110–43114.
- Nojima, T., Hirose, T., Kimura, H., Hagiwara, M., 2007. The interaction between cap-binding complex and RNA export factor is required for intronless mRNA export. *J. Biol. Chem.* 282, 15645–15651.
- Norbury, C.J., 2010. 3' uridylation and the regulation of RNA function in the cytoplasm. *Biochem. Soc. Trans.* 38, 1150.
- Nygård, O., Nilsson, L., 1990. Translational dynamics. Interactions between the translational factors, tRNA and ribosomes during eukaryotic protein synthesis. *Eur. J. Biochem. Febs* 191, 1–17.
- Ogawa, Y., Sun, B.K., Lee, J.T., 2008. Intersection of the RNA interference and X-inactivation pathways. *Science* 320, 1336–1341.
- Ohnishi, T., Yamashita, A., Kashima, I., Schell, T., Anders, K.R., Grimson, A., Hachiya, T., Hentze, M.W., Anderson, P., Ohno, S., 2003. Phosphorylation of hUPF1 induces formation of mRNA surveillance complexes containing hSMG-5 and hSMG-7. *Mol. Cell* 12, 1187–1200.
- Orban, T.I., Izaurralde, E., 2005. Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *Rna New York N* 11, 459–469.
- Orlicky, S.M., Tran, P.T., Sayre, M.H., Edwards, A.M., 2001. Dissociable Rpb4-Rpb7 subassembly of rna polymerase II binds to single-strand nucleic acid and mediates a post-recruitment step in transcription initiation. *J. Biol. Chem.* 276, 10097–10102.
- Ozsolak, F., Kapranov, P., Foissac, S., Kim, S.W., Fishilevich, E., Monaghan, A.P., John, B., Milos, P.M., 2010. Comprehensive polyadenylation site maps in yeast and human reveal pervasive alternative polyadenylation. *Cell* 143, 1018–1029.
- Pak, J., Fire, A., 2007. Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in *C. elegans*. *Science* 315, 241–244.
- Pal, S., Sif, S., 2007. Interplay between chromatin remodelers and protein arginine methyltransferases. *J. Cell. Physiol.* 213, 306–315.
- Panasenko, O., Landrieux, E., Feuermann, M., Finka, A., Paquet, N., Collart, M.A., 2006. The yeast Ccr4-Not complex controls ubiquitination of the nascent-associated polypeptide (NAC-EGD) complex. *J. Biol. Chem.* 281, 31389–31398.
- Panasenko, O.O., Collart, M.A., 2011. Not4 E3 ligase contributes to proteasome assembly and functional integrity in part through Ecm29. *Mol. Cell. Biol.* 31, 1610–1623.
- Panasenko, O.O., David, F.P.A., Collart, M.A., 2009. Ribosome association and stability of the nascent polypeptide-associated complex is dependent upon its own ubiquitination. *Genetics* 181, 447–460.
- Parker, J.S., Roe, S.M., Barford, D., 2005. Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature* 434, 663–666.
- Paronetto, M.P., Achsel, T., Massiello, A., Chalfant, C.E., Sette, C., 2007. The RNA-binding protein Sam68 modulates the alternative splicing of Bcl-x. *J. Cell Biol.* 176, 929–939.
- Parsyan, A., Shahbazian, D., Martineau, Y., Petroulakis, E., Alain, T., Larsson, O., Mathonnet, G., Tettweiler, G., Hellen, C.U., Pestova, T.V., Svitkin, Y.V., Sonenberg,

- N., 2009. The helicase protein DHX29 promotes translation initiation, cell proliferation, and tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 22217–22222.
- Passeri, D., Marcucci, A., Rizzo, G., Billi, M., Panigada, M., Leonardi, L., Tirone, F., Grignani, F., 2006. Btg2 enhances retinoic acid-induced differentiation by modulating histone H4 methylation and acetylation. *Mol. Cell. Biol.* 26, 5023–5032.
- Pawlak, M.R., Scherer, C.A., Chen, J., Roshon, M.J., Ruley, H.E., 2000. Arginine N-methyltransferase 1 is required for early postimplantation mouse development, but cells deficient in the enzyme are viable. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4859–4869.
- Peng, W., Togawa, C., Zhang, K., Kurdistani, S.K., 2008. Regulators of cellular levels of histone acetylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 179, 277–289.
- Perrimon, N., Mahowald, A.P., 1986. *l(1)hopsotch*, A larval-pupal zygotic lethal with a specific maternal effect on segmentation in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 118, 28–41.
- Petfalski, E., Dandekar, T., Henry, Y., Tollervey, D., 1998. Processing of the Precursors to Small Nucleolar RNAs and rRNAs Requires Common Components. *Mol. Cell. Biol.* 18, 1181.
- Petit, A.-P., Wohlbold, L., Bawankar, P., Huntzinger, E., Schmidt, S., Izaurralde, E., Weichenrieder, O., 2012. The structural basis for the interaction between the CAF1 nuclease and the NOT1 scaffold of the human CCR4-NOT deadenylase complex. *Nucleic Acids Res.* 40, 11058–11072.
- Pilz, A., Ramsauer, K., Heidari, H., Leitges, M., Kovarik, P., Decker, T., 2003. Phosphorylation of the Stat1 transactivating domain is required for the response to type I interferons. *EMBO Rep.* 4, 368–373.
- Pisarev, A.V., Hellen, C.U.T., Pestova, T.V., 2007. Recycling of Eukaryotic Posttermination Ribosomal Complexes. *Cell* 131, 286–299.
- Pisareva, V.P., Pisarev, A.V., Komar, A.A., Hellen, C.U.T., Pestova, T.V., 2008. Translation Initiation on Mammalian mRNAs with Structured 5'UTRs Requires DExH-Box Protein DHX29. *Cell* 135, 1237–1250.
- Platanias, L.C., 2005. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 375–386.
- Pollock, C., Huang, S., 2010. The perinucleolar compartment. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a000679.
- Prévôt, D., Morel, A.P., Voeltzel, T., Rostan, M.C., Rimokh, R., Magaud, J.P., Corbo, L., 2001. Relationships of the antiproliferative proteins BTG1 and BTG2 with CAF1, the human homolog of a component of the yeast CCR4 transcriptional complex: involvement in estrogen receptor alpha signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 9640–9648.
- Proudfoot, N.J., 2011. Ending the message: poly(A) signals then and now. *Genes Dev.* 25, 1770–1782.
- Proudfoot, N.J., Furger, A., Dye, M.J., 2002. Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* 108, 501–512.
- Pullmann, R., Jr, Kim, H.H., Abdelmohsen, K., Lal, A., Martindale, J.L., Yang, X., Gorospe, M., 2007. Analysis of turnover and translation regulatory RNA-binding protein expression through binding to cognate mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* 27, 6265–6278.
- Rabani, M., Levin, J.Z., Fan, L., Adiconis, X., Raychowdhury, R., Garber, M., Gnirke, A., Nusbaum, C., Hacohen, N., Friedman, N., Amit, I., Regev, A., 2011. Metabolic labeling of RNA uncovers principles of RNA production and degradation dynamics in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 29, 436–442.
- Raices, M., D'Angelo, M.A., 2012. Nuclear pore complex composition: a new regulator of tissue-specific and developmental functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 687–699.

- Raitskin, O., Cho, D.S., Sperling, J., Nishikura, K., Sperling, R., 2001. RNA editing activity is associated with splicing factors in InRNP particles: The nuclear pre-mRNA processing machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 6571–6576.
- Rajan, P., Gaughan, L., Dalglish, C., El-Sherif, A., Robson, C., Leung, H., Elliott, D., 2008. The RNA-binding and adaptor protein Sam68 modulates signal-dependent splicing and transcriptional activity of the androgen receptor. *J. Pathol.* 215, 67–77.
- Reed, S.I., 1980. The selection of *S. cerevisiae* mutants defective in the start event of cell division. *Genetics* 95, 561–577.
- Rehwinkel, J., Behm-Ansmant, I., Gatfield, D., Izaurralde, E., 2005. A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *Rna New York N* 11, 1640–1647.
- Reijns, M.A.M., Alexander, R.D., Spiller, M.P., Beggs, J.D., 2008. A role for Q/N-rich aggregation-prone regions in P-body localization. *J. Cell Sci.* 121, 2463–2472.
- Ren, Y.-G., Kirsebom, L.A., Virtanen, A., 2004. Coordination of divalent metal ions in the active site of poly(A)-specific ribonuclease. *J. Biol. Chem.* 279, 48702–48706.
- Ren, Y.-G., Martínez, J., Virtanen, A., 2002. Identification of the active site of poly(A)-specific ribonuclease by site-directed mutagenesis and Fe(2+)-mediated cleavage. *J. Biol. Chem.* 277, 5982–5987.
- Reverdatto, S.V., Dutko, J.A., Chekanova, J.A., Hamilton, D.A., Belostotsky, D.A., 2004. mRNA deadenylation by PARN is essential for embryogenesis in higher plants. *Rna New York N* 10, 1200–1214.
- Rinn, J.L., Kertesz, M., Wang, J.K., Squazzo, S.L., Xu, X., Bruggmann, S.A., Goodnough, L.H., Helms, J.A., Farnham, P.J., Segal, E., Chang, H.Y., 2007. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* 129, 1311–1323.
- Rissland, O.S., Norbury, C.J., 2009. Decapping is preceded by 3' uridylation in a novel pathway of bulk mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 616–623.
- Robin-Lespinasse, Y., Sentis, S., Kolytcheff, C., Rostan, M.-C., Corbo, L., Le Romancer, M., 2007. hCAF1, a new regulator of PRMT1-dependent arginine methylation. *J. Cell Sci.* 120, 638–647.
- Rodgers, N.D., Wang, Z., Kiledjian, M., 2002. Characterization and purification of a mammalian endoribonuclease specific for the alpha-globin mRNA. *J. Biol. Chem.* 277, 2597–2604.
- Rospert, S., Dubaquié, Y., Gautschi, M., 2002. Nascent-polypeptide-associated complex. *Cell. Mol. Life Sci. Cmls* 59, 1632–1639.
- Rouault, J.P., Prévôt, D., Berthet, C., Birot, A.M., Billaud, M., Magaud, J.P., Corbo, L., 1998. Interaction of BTG1 and p53-regulated BTG2 gene products with mCaf1, the murine homolog of a component of the yeast CCR4 transcriptional regulatory complex. *J. Biol. Chem.* 273, 22563–22569.
- Rouget, C., Papin, C., Boureux, A., Meunier, A.-C., Franco, B., Robine, N., Lai, E.C., Pelisson, A., Simonelig, M., 2010. Maternal mRNA deadenylation and decay by the piRNA pathway in the early *Drosophila* embryo. *Nature* 467, 1128–1132.
- Rozen, F., Edery, I., Meerovitch, K., Dever, T.E., Merrick, W.C., Sonenberg, N., 1990. Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F. *Mol. Cell. Biol.* 10, 1134–1144.
- Rueter, S.M., Dawson, T.R., Emeson, R.B., 1999. Regulation of alternative splicing by RNA editing. *Nature* 399, 75–80.
- Runner, V.M., Podolny, V., Buratowski, S., 2008. The Rpb4 subunit of RNA polymerase II contributes to cotranscriptional recruitment of 3' processing factors. *Mol. Cell. Biol.* 28, 1883–1891.

- Russell, P., Benson, J.D., Denis, C.L., 2002. Characterization of mutations in NOT2 indicates that it plays an important role in maintaining the integrity of the CCR4-NOT complex. *J. Mol. Biol.* 322, 27–39.
- Sachs, A.B., Deardorff, J.A., 1992. Translation initiation requires the PAB-dependent poly(A) ribonuclease in yeast. *Cell* 70, 961–973.
- Saito, K., Nishida, K.M., Mori, T., Kawamura, Y., Miyoshi, K., Nagami, T., Siomi, H., Siomi, M.C., 2006. Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the *Drosophila* genome. *Genes Dev.* 20, 2214–2222.
- Sakai, A., Chibazakura, T., Shimizu, Y., Hishinuma, F., 1992. Molecular analysis of POP2 gene, a gene required for glucose-derepression of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 20, 6227–6233.
- Sakamaki, J., Daitoku, H., Ueno, K., Hagiwara, A., Yamagata, K., Fukamizu, A., 2011. Arginine methylation of BCL-2 antagonist of cell death (BAD) counteracts its phosphorylation and inactivation by Akt. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 6085–6090.
- Sarot, E., Payen-Groschêne, G., Bucheton, A., Péliesson, A., 2004. Evidence for a piwi-dependent RNA silencing of the gypsy endogenous retrovirus by the *Drosophila melanogaster* flamenco gene. *Genetics* 166, 1313–1321.
- Sarowar, S., Oh, H.W., Cho, H.S., Baek, K.-H., Seong, E.S., Joung, Y.H., Choi, G.J., Lee, S., Choi, D., 2007. Capsicum annum CCR4-associated factor CaCAF1 is necessary for plant development and defence response. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 51, 792–802.
- Schul, W., Groenhout, B., Koberna, K., Takagaki, Y., Jenny, A., Manders, E.M., Raska, I., van Driel, R., de Jong, L., 1996. The RNA 3' cleavage factors CstF 64 kDa and CPSF 100 kDa are concentrated in nuclear domains closely associated with coiled bodies and newly synthesized RNA. *Embo J.* 15, 2883–2892.
- Schütz, P., Bumann, M., Oberholzer, A.E., Bieniossek, C., Trachsel, H., Altmann, M., Baumann, U., 2008. Crystal structure of the yeast eIF4A-eIF4G complex: an RNA-helicase controlled by protein-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 9564–9569.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., Zamore, P.D., 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199–208.
- Selitrennik, M., Duek, L., Lotan, R., Choder, M., 2006. Nucleocytoplasmic shuttling of the Rpb4p and Rpb7p subunits of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase II by two pathways. *Eukaryot. Cell* 5, 2092–2103.
- Sen, G.L., Blau, H.M., 2005. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat. Cell Biol.* 7, 633–636.
- Shalem, O., Dahan, O., Levo, M., Martinez, M.R., Furman, I., Segal, E., Pilpel, Y., 2008. Transient transcriptional responses to stress are generated by opposing effects of mRNA production and degradation. *Mol. Syst. Biol.* 4, 223.
- Shalem, O., Groisman, B., Choder, M., Dahan, O., Pilpel, Y., 2011. Transcriptome kinetics is governed by a genome-wide coupling of mRNA production and degradation: a role for RNA Pol II. *Plos Genet.* 7, e1002273.
- Shatkin, A.J., 1976. Capping of eucaryotic mRNAs. *Cell* 9, 645–653.
- Shaw, G., Kamen, R., 1986. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 46, 659–667.
- Shen, E.C., Henry, M.F., Weiss, V.H., Valentini, S.R., Silver, P.A., Lee, M.S., 1998. Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins. *Genes Dev.* 12, 679–691.
- Sheth, U., Parker, R., 2003. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* 300, 805–808.

- Sheth, U., Parker, R., 2006. Targeting of aberrant mRNAs to cytoplasmic processing bodies. *Cell* 125, 1095–1109.
- Shevtsov, S.P., Dundr, M., 2011. Nucleation of nuclear bodies by RNA. *Nat. Cell Biol.* 13, 167–173.
- Shuai, K., 2006. Regulation of cytokine signaling pathways by PIAS proteins. *Cell Res.* 16, 196–202.
- Shuai, K., Horvath, C.M., Huang, L.H., Qureshi, S.A., Cowburn, D., Darnell, J.E., Jr, 1994. Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell* 76, 821–828.
- Shuai, K., Liu, B., 2005. Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 593–605.
- Shuman, S., 2001. Structure, mechanism, and evolution of the mRNA capping apparatus. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 66, 1–40.
- Simos, G., Hurt, E., 1999. Transfer RNA biogenesis: A visa to leave the nucleus. *Curr. Biol. Cb* 9, R238–241.
- Sims, R.J., Belotserkovskaya, R., Reinberg, D., 2004. Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes Dev.* 18, 2437–2468.
- Singh, G., Jakob, S., Kleedehn, M.G., Lykke-Andersen, J., 2007. Communication with the exon-junction complex and activation of nonsense-mediated decay by human Upf proteins occur in the cytoplasm. *Mol. Cell* 27, 780–792.
- Singh, G., Kucukural, A., Cenik, C., Leszyk, J.D., Shaffer, S.A., Weng, Z., Moore, M.J., 2012. The cellular EJC interactome reveals higher-order mRNP structure and an EJC-SR protein nexus. *Cell* 151, 750–764.
- Smith, W.A., Schurter, B.T., Wong-Staal, F., David, M., 2004. Arginine methylation of RNA helicase a determines its subcellular localization. *J. Biol. Chem.* 279, 22795–22798.
- Sonenberg, N., Morgan, M.A., Merrick, W.C., Shatkin, A.J., 1978. A polypeptide in eukaryotic initiation factors that crosslinks specifically to the 5'-terminal cap in mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 4843–4847.
- Song, J.-J., Liu, J., Tolia, N.H., Schneiderman, J., Smith, S.K., Martienssen, R.A., Hannon, G.J., Joshua-Tor, L., 2003. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat. Struct. Biol.* 10, 1026–1032.
- Song, J.-J., Smith, S.K., Hannon, G.J., Joshua-Tor, L., 2004. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305, 1434–1437.
- Stark, G.R., 2007. How cells respond to interferons revisited: from early history to current complexity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 18, 419–423.
- Stark, G.R., Darnell, J.E., Jr, 2012. The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity* 36, 503–514.
- Steiger, M., Carr-Schmid, A., Schwartz, D.C., Kiledjian, M., Parker, R., 2003. Analysis of recombinant yeast decapping enzyme. *Rna New York N* 9, 231–238.
- Stephanou, A., Brar, B.K., Knight, R.A., Latchman, D.S., 2000. Opposing actions of STAT-1 and STAT-3 on the Bcl-2 and Bcl-x promoters. *Cell Death Differ.* 7, 329–330.
- Stoecklin, G., Stubbs, T., Kedersha, N., Wax, S., Rigby, W.F.C., Blackwell, T.K., Anderson, P., 2004. MK2-induced tristetraprolin:14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay. *Embo J.* 23, 1313–1324.
- Stoneley, M., Willis, A.E., 2004. Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene* 23, 3200–3207.
- Strahl, B.D., Allis, C.D., 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41–45.

- Strahl, B.D., Briggs, S.D., Brame, C.J., Caldwell, J.A., Koh, S.S., Ma, H., Cook, R.G., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Stallcup, M.R., Allis, C.D., 2001. Methylation of histone H4 at arginine 3 occurs in vivo and is mediated by the nuclear receptor coactivator PRMT1. *Curr. Biol. Cb* 11, 996–1000.
- Stronach, E.A., Alfraid, A., Rama, N., Datler, C., Studd, J.B., Agarwal, R., Guney, T.G., Gourley, C., Hennessy, B.T., Mills, G.B., Mai, A., Brown, R., Dina, R., Gabra, H., 2011. HDAC4-regulated STAT1 activation mediates platinum resistance in ovarian cancer. *Cancer Res.* 71, 4412–4422.
- Struhl, K., 2007. Transcriptional noise and the fidelity of initiation by RNA polymerase II. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 103–105.
- Sun, L., Stoecklin, G., Van Way, S., Hinkovska-Galcheva, V., Guo, R.-F., Anderson, P., Shanley, T.P., 2007. Tristetraprolin (TTP)-14-3-3 complex formation protects TTP from dephosphorylation by protein phosphatase 2a and stabilizes tumor necrosis factor- α mRNA. *J. Biol. Chem.* 282, 3766–3777.
- Sun, M., Schwalb, B., Schulz, D., Pirk, N., Etzold, S., Larivière, L., Maier, K.C., Seizl, M., Tresch, A., Cramer, P., 2012. Comparative dynamic transcriptome analysis (cDTA) reveals mutual feedback between mRNA synthesis and degradation. *Genome Res.* 22, 1350–1359.
- Svoboda, P., Stein, P., Anger, M., Bernstein, E., Hannon, G.J., Schultz, R.M., 2004. RNAi and expression of retrotransposons MuERV-L and IAP in preimplantation mouse embryos. *Dev. Biol.* 269, 276–285.
- Tahk, S., Liu, B., Chernishof, V., Wong, K.A., Wu, H., Shuai, K., 2007. Control of specificity and magnitude of NF- κ B and STAT1-mediated gene activation through PIASy and PIAS1 cooperation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 11643–11648.
- Tang, J., Frankel, A., Cook, R.J., Kim, S., Paik, W.K., Williams, K.R., Clarke, S., Herschman, H.R., 2000. PRMT1 is the predominant type I protein arginine methyltransferase in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 275, 7723–7730.
- Temme, C., Zaessinger, S., Meyer, S., Simonelig, M., Wahle, E., 2004. A complex containing the CCR4 and CAF1 proteins is involved in mRNA deadenylation in *Drosophila*. *Embo J.* 23, 2862–2871.
- Teyssier, C., Ma, H., Emter, R., Kralli, A., Stallcup, M.R., 2005. Activation of nuclear receptor coactivator PGC-1 α by arginine methylation. *Genes Dev.* 19, 1466–1473.
- Thomas, M.C., Chiang, C.-M., 2006. The general transcription machinery and general cofactors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 41, 105–178.
- Thomson, T., Lasko, P., 2004. *Drosophila* tudor is essential for polar granule assembly and pole cell specification, but not for posterior patterning. *Genes. New York N* 2000 40, 164–170.
- Thomson, T., Liu, N., Arkov, A., Lehmann, R., Lasko, P., 2008. Isolation of new polar granule components in *Drosophila* reveals P body and ER associated proteins. *Mech. Dev.* 125, 865–873.
- Thore, S., Mauxion, F., Séraphin, B., Suck, D., 2003. X-ray structure and activity of the yeast Pop2 protein: a nuclease subunit of the mRNA deadenylase complex. *EMBO Rep.* 4, 1150–1155.
- Tian, B., Hu, J., Zhang, H., Lutz, C.S., 2005. A large-scale analysis of mRNA polyadenylation of human and mouse genes. *Nucleic Acids Res.* 33, 201–212.
- Tomari, Y., Du, T., Zamore, P.D., 2007. Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs. *Cell* 130, 299–308.
- Torchet, C., Bousquet-Antonelli, C., Milligan, L., Thompson, E., Kufel, J., Tollervey, D., 2002. Processing of 3'-extended read-through transcripts by the exosome can generate functional mRNAs. *Mol. Cell* 9, 1285–1296.

- Townsend, P.A., Scarabelli, T.M., Davidson, S.M., Knight, R.A., Latchman, D.S., Stephanou, A., 2004. STAT-1 interacts with p53 to enhance DNA damage-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279, 5811–5820.
- Trcek, T., Larson, D.R., Moldón, A., Query, C.C., Singer, R.H., 2011. Single-molecule mRNA decay measurements reveal promoter- regulated mRNA stability in yeast. *Cell* 147, 1484–1497.
- Tucker, M., Staples, R.R., Valencia-Sanchez, M.A., Muhlrads, D., Parker, R., 2002a. Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J.* 21, 1427–1436.
- Tucker, M., Staples, R.R., Valencia-Sanchez, M.A., Muhlrads, D., Parker, R., 2002b. Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J.* 21, 1427–1436.
- Tucker, M., Valencia-Sanchez, M.A., Staples, R.R., Chen, J., Denis, C.L., Parker, R., 2001. The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 104, 377–386.
- Tuschl, T., Zamore, P.D., Lehmann, R., Bartel, D.P., Sharp, P.A., 1999. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev.* 13, 3191–3197.
- Tyree, C.M., George, C.P., Lira-DeVito, L.M., Wampler, S.L., Dahmus, M.E., Zawel, L., Kadonaga, J.T., 1993. Identification of a minimal set of proteins that is sufficient for accurate initiation of transcription by RNA polymerase II. *Genes Dev.* 7, 1254–1265.
- Uchida, N., Hoshino, S.-I., Katada, T., 2004. Identification of a human cytoplasmic poly(A) nuclease complex stimulated by poly(A)-binding protein. *J. Biol. Chem.* 279, 1383–1391.
- Ujvári, A., Luse, D.S., 2006. RNA emerging from the active site of RNA polymerase II interacts with the Rpb7 subunit. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 49–54.
- Ungureanu, D., Vanhatupa, S., Grönholm, J., Palvimo, J.J., Silvennoinen, O., 2005. SUMO-1 conjugation selectively modulates STAT1-mediated gene responses. *Blood* 106, 224–226.
- Unterholzner, L., Izaurralde, E., 2004. SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay. *Mol. Cell* 16, 587–596.
- Vagin, V.V., Sigova, A., Li, C., Seitz, H., Gvozdev, V., Zamore, P.D., 2006. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science* 313, 320–324.
- Van Dijk, E.L., Sussenbach, J.S., Holthuisen, P.E., 2001. Kinetics and regulation of site-specific endonucleolytic cleavage of human IGF-II mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 29, 3477–3486.
- Van Hoof, A., Frischmeyer, P.A., Dietz, H.C., Parker, R., 2002. Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science* 295, 2262–2264.
- Varga-Weisz, P.D., Becker, P.B., 1995. Transcription factor-mediated chromatin remodelling: mechanisms and models. *Febs Lett.* 369, 118–121.
- Venema, J., Tollervey, D., 1999. Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* 33, 261–311.
- Venters, B.J., Wachi, S., Mavrich, T.N., Andersen, B.E., Jena, P., Sinnamon, A.J., Jain, P., Roller, N.S., Jiang, C., Hemeryck-Walsh, C., Pugh, B.F., 2011. A comprehensive genomic binding map of gene and chromatin regulatory proteins in *Saccharomyces*. *Mol. Cell* 41, 480–492.

- Verdel, A., Jia, S., Gerber, S., Sugiyama, T., Gygi, S., Grewal, S.I.S., Moazed, D., 2004. RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* 303, 672–676.
- Verma-Gaur, J., Rao, S.N., Taya, T., Sadhale, P., 2008. Genomewide recruitment analysis of Rpb4, a subunit of polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*, reveals its involvement in transcription elongation. *Eukaryot. Cell* 7, 1009–1018.
- Viswanathan, P., Ohn, T., Chiang, Y.-C., Chen, J., Denis, C.L., 2004. Mouse CAF1 can function as a processive deadenylase/3'-5'-exonuclease in vitro but in yeast the deadenylase function of CAF1 is not required for mRNA poly(A) removal. *J. Biol. Chem.* 279, 23988–23995.
- Volpe, T.A., Kidner, C., Hall, I.M., Teng, G., Grewal, S.I.S., Martienssen, R.A., 2002. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 297, 1833–1837.
- Wagner, E., Clement, S.L., Lykke-Andersen, J., 2007. An unconventional human Ccr4-Caf1 deadenylase complex in nuclear cajal bodies. *Mol. Cell. Biol.* 27, 1686–1695.
- Wang, B., Yanez, A., Novina, C.D., 2008. MicroRNA-repressed mRNAs contain 40S but not 60S components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 5343–5348.
- Wang, H., Huang, Z.Q., Xia, L., Feng, Q., Erdjument-Bromage, H., Strahl, B.D., Briggs, S.D., Allis, C.D., Wong, J., Tempst, P., Zhang, Y., 2001. Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science* 293, 853–857.
- Wang, H., Morita, M., Yang, X., Suzuki, T., Yang, W., Wang, J., Ito, K., Wang, Q., Zhao, C., Bartlam, M., Yamamoto, T., Rao, Z., 2010. Crystal structure of the human CNOT6L nuclease domain reveals strict poly(A) substrate specificity. *Embo J.* 29, 2566–2576.
- Wang, Z., Jiao, X., Carr-Schmid, A., Kiledjian, M., 2002. The hDcp2 protein is a mammalian mRNA decapping enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12663–12668.
- Watanabe, T., Takeda, A., Tsukiyama, T., Mise, K., Okuno, T., Sasaki, H., Minami, N., Imai, H., 2006. Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. *Genes Dev.* 20, 1732–1743.
- Weis, K., 2007. The nuclear pore complex: oily spaghetti or gummy bear? *Cell* 130, 405–407.
- Wek, R.C., Jiang, H.-Y., Anthony, T.G., 2006. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 7–11.
- Wells, S.E., Hillner, P.E., Vale, R.D., Sachs, A.B., 1998. Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol. Cell* 2, 135–140.
- Wen, J., Brogna, S., 2010. Splicing-dependent NMD does not require the EJC in *Schizosaccharomyces pombe*. *Embo J.* 29, 1537–1551.
- Wen, Z., Darnell, J.E., Jr, 1997. Mapping of Stat3 serine phosphorylation to a single residue (727) and evidence that serine phosphorylation has no influence on DNA binding of Stat1 and Stat3. *Nucleic Acids Res.* 25, 2062–2067.
- Wesemann, D.R., Qin, H., Kokorina, N., Benveniste, E.N., 2004. TRADD interacts with STAT1-alpha and influences interferon-gamma signaling. *Nat. Immunol.* 5, 199–207.
- Wilczynska, A., Aigueperse, C., Kress, M., Dautry, F., Weil, D., 2005. The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules. *J. Cell Sci.* 118, 981–992.
- Will, C.L., Lührmann, R., 2001. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 290–301.
- Wilusz, J.E., Spector, D.L., 2010. An unexpected ending: noncanonical 3' end processing mechanisms. *Rna New York N* 16, 259–266.

- Winkler, G.S., Albert, T.K., Dominguez, C., Legtenberg, Y.I.A., Boelens, R., Timmers, H.T.M., 2004. An altered-specificity ubiquitin-conjugating enzyme/ubiquitin-protein ligase pair. *J. Mol. Biol.* 337, 157–165.
- Winkler, G.S., Mulder, K.W., Bardwell, V.J., Kalkhoven, E., Timmers, H.T.M., 2006. Human Ccr4-Not complex is a ligand-dependent repressor of nuclear receptor-mediated transcription. *Embo J.* 25, 3089–3099.
- Wreden, C., Verrotti, A.C., Schisa, J.A., Lieberfarb, M.E., Strickland, S., 1997. Nanos and pumilio establish embryonic polarity in *Drosophila* by promoting posterior deadenylation of hunchback mRNA. *Dev. Camb. Engl.* 124, 3015–3023.
- Wu, M., Nilsson, P., Henriksson, N., Niedzwiecka, A., Lim, M.K., Cheng, Z., Kokkoris, K., Virtanen, A., Song, H., 2009. Structural basis of m(7)GpppG binding to poly(A)-specific ribonuclease. *Struct. Lond. Engl.* 1993 17, 276–286.
- Wyers, F., Rougemaille, M., Badis, G., Rousselle, J.-C., Dufour, M.-E., Boulay, J., Régnault, B., Devaux, F., Namane, A., Séraphin, B., Libri, D., Jacquier, A., 2005. Cryptic pol II transcripts are degraded by a nuclear quality control pathway involving a new poly(A) polymerase. *Cell* 121, 725–737.
- Wysocka, J., Allis, C.D., Coonrod, S., 2006. Histone arginine methylation and its dynamic regulation. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 11, 344–355.
- Xie, Y., Ke, S., Ouyang, N., He, J., Xie, W., Bedford, M.T., Tian, Y., 2009. Epigenetic regulation of transcriptional activity of pregnane X receptor by protein arginine methyltransferase 1. *J. Biol. Chem.* 284, 9199–9205.
- Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S.E., Carrington, J.C., 2004. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *Plos Biol.* 2, E104.
- Xu, C., Henry, M.F., 2004. Nuclear export of hnRNP Hrp1p and nuclear export of hnRNP Npl3p are linked and influenced by the methylation state of Npl3p. *Mol. Cell. Biol.* 24, 10742–10756.
- Xu, X., Fu, X.Y., Plate, J., Chong, A.S., 1998. IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. *Cancer Res.* 58, 2832–2837.
- Xu, X., Sun, Y.L., Hoey, T., 1996. Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science* 273, 794–797.
- Yamashita, A., Chang, T.-C., Yamashita, Y., Zhu, W., Zhong, Z., Chen, C.-Y.A., Shyu, A.-B., 2005. Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 1054–1063.
- Yan, R., Small, S., Desplan, C., Dearolf, C.R., Darnell, J.E., Jr, 1996. Identification of a Stat gene that functions in *Drosophila* development. *Cell* 84, 421–430.
- Yang, J., Stark, G.R., 2008. Roles of unphosphorylated STATs in signaling. *Cell Res.* 18, 443–451.
- Yang, J.H., Sklar, P., Axel, R., Maniatis, T., 1995. Editing of glutamate receptor subunit B pre-mRNA in vitro by site-specific deamination of adenosine. *Nature* 374, 77–81.
- Yang, Y., Lu, Y., Espejo, A., Wu, J., Xu, W., Liang, S., Bedford, M.T., 2010. TDRD3 is an effector molecule for arginine-methylated histone marks. *Mol. Cell* 40, 1016–1023.
- Yang, Z., Jakymiw, A., Wood, M.R., Eystathioy, T., Rubin, R.L., Fritzler, M.J., Chan, E.K.L., 2004. GW182 is critical for the stability of GW bodies expressed during the cell cycle and cell proliferation. *J. Cell Sci.* 117, 5567–5578.
- Young, R.A., 1991. RNA polymerase II. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 689–715.
- Yu, J.H., Yang, W.-H., Gulick, T., Bloch, K.D., Bloch, D.B., 2005. Ge-1 is a central component of the mammalian cytoplasmic mRNA processing body. *Rna New York N* 11, 1795–1802.

- Yu, M.C., Bachand, F., McBride, A.E., Komili, S., Casolari, J.M., Silver, P.A., 2004. Arginine methyltransferase affects interactions and recruitment of mRNA processing and export factors. *Genes Dev.* 18, 2024–2035.
- Yu, M.C., Lamming, D.W., Eskin, J.A., Sinclair, D.A., Silver, P.A., 2006. The role of protein arginine methylation in the formation of silent chromatin. *Genes Dev.* 20, 3249–3254.
- Yu, Z., Chen, T., Hébert, J., Li, E., Richard, S., 2009. A mouse PRMT1 null allele defines an essential role for arginine methylation in genome maintenance and cell proliferation. *Mol. Cell. Biol.* 29, 2982–2996.
- Yudkovsky, N., Ranish, J.A., Hahn, S., 2000. A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature* 408, 225–229.
- Zaessinger, S., Busseau, I., Simonelig, M., 2006. Oskar allows nanos mRNA translation in *Drosophila* embryos by preventing its deadenylation by Smaug/CCR4. *Dev. Camb. Engl.* 133, 4573–4583.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., Bartel, D.P., 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25–33.
- Zaratiegui, M., Castel, S.E., Irvine, D.V., Kloc, A., Ren, J., Li, F., de Castro, E., Marín, L., Chang, A.-Y., Goto, D., Cande, W.Z., Antequera, F., Arcangioli, B., Martienssen, R.A., 2011. RNAi promotes heterochromatic silencing through replication-coupled release of RNA Pol II. *Nature* 479, 135–138.
- Zawel, L., Kumar, K.P., Reinberg, D., 1995. Recycling of the general transcription factors during RNA polymerase II transcription. *Genes Dev.* 9, 1479–1490.
- Zeidler, M.P., Bach, E.A., Perrimon, N., 2000. The roles of the *Drosophila* JAK/STAT pathway. *Oncogene* 19, 2598–2606.
- Zekri, L., Kuzuoğlu-Öztürk, D., Izaurralde, E., 2013. GW182 proteins cause PABP dissociation from silenced miRNA targets in the absence of deadenylation. *Embo J.*
- Zeng, Y., Cullen, B.R., 2003. Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *Rna New York N* 9, 112–123.
- Zhang, C., Darnell, R.B., 2011. Mapping in vivo protein-RNA interactions at single-nucleotide resolution from HITS-CLIP data. *Nat. Biotechnol.* 29, 607–614.
- Zhang, K., Mosch, K., Fischle, W., Grewal, S.I.S., 2008. Roles of the Ctr4 methyltransferase complex in nucleation, spreading and maintenance of heterochromatin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 381–388.
- Zhao, J., Sun, B.K., Erwin, J.A., Song, J.-J., Lee, J.T., 2008. Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science* 322, 750–756.
- Zheng, D., Ezzeddine, N., Chen, C.-Y.A., Zhu, W., He, X., Shyu, A.-B., 2008. Deadenylation is prerequisite for P-body formation and mRNA decay in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 182, 89–101.
- Zhouravleva, G., Frolova, L., Le Goff, X., Le Guellec, R., Inge-Vechtomov, S., Kisselev, L., Philippe, M., 1995. Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. *Embo J.* 14, 4065–4072.
- Zhuang, S., 2013. Regulation of STAT signaling by acetylation. *Cell. Signal.*
- Zuo, Y., Deutscher, M.P., 2001. Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Res.* 29, 1017–1026.
- Zwartjes, C.G.M., Jayne, S., van den Berg, D.L.C., Timmers, H.T.M., 2004. Repression of promoter activity by CNOT2, a subunit of the transcription regulatory Ccr4-not complex. *J. Biol. Chem.* 279, 10848–10854.

De la synthèse des ARNm jusqu'à leur dégradation, le complexe CCR4-NOT est un régulateur essentiel de l'expression des gènes eucaryotes. CAF1 est une sous-unité catalytique qui joue un rôle central dans la fonction de ce complexe. La protéine humaine hCAF1 possède une activité déadénylase, régule la méthylation des arginines dépendante de PRMT1 et est un régulateur transcriptionnel des récepteurs nucléaires. Bien que l'ensemble des travaux publiés sur hCAF1 lui confère une place importante dans la régulation de l'expression des gènes, son mécanisme d'action et surtout les voies de signalisation qu'elle régule restent encore mal compris dans les cellules humaines.

Lors de ce travail de thèse, nous avons mis en évidence une nouvelle fonction de la protéine hCAF1 comme régulateur de la voie des interférons *via* le contrôle du facteur de transcription STAT1 et la dégradation de ses ARNm cibles. L'identification de hCAF1 comme régulateur de l'activité de STAT1 et de la réponse aux interférons est très importante car des activations anormales de ces voies sont associées à de nombreuses pathologies telles que le cancer ou des maladies immunitaires. En parallèle, nous avons caractérisé un nouvel isoforme nommé hCAF1v2 produit par le gène humain *Caf1* suite à un évènement d'épissage alternatif. Nos résultats indiquent que hCAF1v2 présente une divergence fonctionnelle vis-à-vis de hCAF1 puisqu'elle ne possède pas d'activité déadénylase intrinsèque et s'avère requise pour la régulation de la méthylation des arginines *via* son interaction avec l'enzyme PRMT1. L'ensemble des résultats obtenus identifient une nouvelle voie de signalisation régulée par la protéine hCAF1 dans les cellules humaines et permettent de mieux comprendre l'implication du complexe CCR4-NOT dans les mécanismes de régulation de l'expression des gènes.

Novel roles of CCR4-NOT complex in the control of eukaryotic gene expression

The multi-subunit CCR4-NOT complex has been implicated in all aspects of the mRNA life cycle, from synthesis of mRNAs in the nucleus to their degradation in the cytoplasm. The CAF1 protein is a catalytic subunit which plays a central role inside the complex. Human CAF1 is a deadenylase, modulates arginine methylation, and is a transcriptional cofactor of several nuclear receptors.

The main objective of the thesis was to elucidate the molecular mechanism of hCAF1-mediated gene expression. We reported that hCAF1 is an important negative regulator of the interferon pathway and that hCAF1 is associated in the cytoplasm of resting cells with STAT1, a crucial transcription factor of this pathway. We found that hCAF1 participates in the extinction of the IFN signal via its deadenylase activity, by speeding up the degradation of some STAT1-induced mRNAs. Our findings are important because abnormal activations of this pathway are frequently associated with cancer and auto-immune diseases. In parallel, we characterized a novel isoform called hCAF1v2 produced by alternative splicing of the *Caf1* gene. We reported that hCAF1v2 displays divergent functions compared with hCAF1. In fact hCAF1v2 does not have a deadenylase activity and is preferentially associated with PRMT1 to modulate arginine methylation. Altogether, our findings identify a new signalling pathway which is regulated by hCAF1, and reveal novel mechanisms utilized by the CCR4-NOT complex to control gene expression.

Mots-clés : CCR4-NOT, hCAF1, STAT1, interferon, déadénylation, PRMT1

Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon. UMR INSERM 1052 – CNRS 5286

Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec, 69373 Lyon Cedex 08, France